UNIVERSITY OF HAWAII LIBRARY

Postverlagsort Berlin

ZEITSCHRIFT
FÜR INDUKTIVE ABSTAMMUNGS- UND
VERERBUNGSLEHRE

HERAUSGEGEBEN UND GELEITET
VON
CH. AUERBACH · H. BAUER · E. HADORN · A. KÜHN
G. MELCHERS · F. OEHLKERS · H. STUBBE

87. BAND 5. (SCHLUSS-)HEFT
MIT 67 TEXTABBILDUNGEN
(ABGESCHLOSSEN AM 20. NOVEMBER 1956)

SPRINGER-VERLAG
BERLIN · GÖTTINGEN · HEIDELBERG
1956

DICAL
1301
4
57
Z. Ver-
ungslehre

Preis DM 45.80

Zeitschrift für induktive Abstammungs- und Vererbungslehre

Begründet 1908. Herausgegeben von C. Correns, V. Haecker, G. Steinmann, R. v. Wettstein, Erwin Baur u. a. Band 1—81 (1944) Berlin, Gebr. Bornträger, ab Band 82 (1948) Berlin, Springer.

Die „**Zeitschrift für induktive Abstammungs- und Vererbungslehre**“ erscheint nach Maßgabe des eingehenden Materials zwanglos in einzeln berechneten Heften, die zu Bänden vereinigt werden.

Manuskripte sind *unter Berücksichtigung der besonderen Arbeitsrichtung* an einen der nachstehenden Herausgeber zu senden:

Dr. Charlotte Auerbach, Institute of Animal Genetics, Kings Buildings, West Mains Road, Edinburgh/Schottland,

Professor Dr. Hans Bauer, Wilhelmshaven, Max-Planck-Institut für Meeresbiologie, Anton-Dohrn-Weg,

Professor Dr. Ernst Hadorn, Zürich (Schweiz), Zoologisches Institut der Universität, Künstlergasse 16,

Professor Dr. Alfred Kühn, Tübingen, Max-Planck-Institut für Biologie, Spemannstraße 34,

Professor Dr. Georg Melchers, Tübingen, Max-Planck-Institut für Biologie, Corrensstraße 41,

Professor Dr. Friedrich Oehlkers, Freiburg i. Br., Botanisches Institut, Schänzlestraße 9—11,

Professor Dr. Hans Stubbe, Gatersleben (Bezirk Halle), Institut für Kulturpflanzenforschung.

Es wird ausdrücklich darauf aufmerksam gemacht, daß mit der Annahme des Manuskriptes und seiner Veröffentlichung durch den Verlag das ausschließliche Verlagsrecht für alle Sprachen und Länder an den Verlag übergeht. Grundsätzlich dürfen nur Arbeiten eingereicht werden, die vorher weder im Inland noch im Ausland veröffentlicht worden sind und die auch nachträglich nicht anderweitig zu veröffentlichen der Autor sich verpflichtet.

Bei den Arbeiten aus Instituten, Kliniken usw. ist eine Erklärung des Direktors oder eines Abteilungsleiters beizufügen, daß er mit der Publikation der Arbeit aus dem Institut bzw. der Abteilung einverstanden ist und den Verfasser auf die Aufnahmebedingungen aufmerksam gemacht hat.

Von jeder Arbeit werden 75 Sonderabdrucke unentgeltlich geliefert.

Dissertationen und Habilitationsschriften werden als solche nicht in die Zeitschrift aufgenommen. Ist eine in die Zeitschrift aufgenommene Arbeit als Dissertation oder Habilitationsschrift von einer Fakultät angenommen, darf dies durch eine Fußnote vermerkt werden. Mit allen für eine Dissertations- oder Habilitationsschrift notwendigen Sonderausstattungen (besonderer Titel, Lebenslauf usw.) befaßt sich der Verlag grundsätzlich nicht, er stellt jedoch den Doktoranden bzw. Dozenten den Satz zur Verfügung zwecks Anfertigung der Dissertations- bzw. Habilitationsexemplare.

Der Autor erhält einen Unkostenersatz für Originalabhandlungen und kleinere Mitteilungen von DM 20.— für den 16seitigen Druckbogen.

Alle Korrekturen sind an

Professor Dr. Georg Melchers, (14b) *Tübingen, Max-Planck-Institut für Biologie, Corrensstraße 41,*

alle die Zeitschrift betreffenden *geschäftlichen* Mitteilungen an den

Springer-Verlag, (17a) *Heidelberg, Neuenheimer Landstraße 28—30*

zu senden.

Die geschäftsführenden Herausgeber:
G. Melchers
H. Stubbe

Berlin W 35
Reichpietschufer 20
Fernsprecher: 24 92 51

Die Wiedergabe von Gebrauchsnamen, Handelsnamen, Warenbezeichnungen usw. in dieser Zeitschrift berechtigt auch ohne besondere Kennzeichnung nicht zu der Annahme, daß solche Namen im Sinn der Warenzeichen- und Markenschutz-Gesetzgebung als frei zu betrachten wären und daher von jedermann benutzt werden dürften.

Inhaltsverzeichnis auf Seite 3

Zeitschrift für indukt. Abstammungs- und Vererbungslehre, Bd. 87, S. 627—647 (1956)

Institute of Animal Genetics, Edinburgh

ANALYSIS OF THE MUTAGENIC ACTION OF FORMALDEHYDE FOOD

III. CONDITIONS INFLUENCING THE EFFECTIVENESS OF THE TREATMENT

By

C. Auerbach

With 6 figures in the text

(Eingegangen am 18. Juni 1956)

Table of contents

page

Introduction 627
Material and Methods 628
Results 629
I. Effect of the larvae on the treated medium 629
a) Mutations p. 629. — b) Survival p. 632. — c) Modifications p. 632.
II. Storing of treated medium without larvae 634
III. Composition of the medium 635
IV. Supplementary chemical treatment 636
V. Population density during treatment 638
VI. Individual differences between larvae 640
VII. Differences between strains 640
Discussion 641
Summary 645
Literature 647

Introduction

When 0.2% formaldehyde is added to the food of *Drosophila* larvae, the induced mutation rate may vary from 0—15%. Before any useful work with formaldehyde food could be undertaken, the principal causes of this enormous variability had to be elucidated. This had already been accomplished in a rough way some years ago, sufficient for an analysis of the various genetical effects of the treatment to be carried out (Auerbach and Moser 1953b). The investigation was continued beyond the attainment of this immediate practical purpose, because it was felt that a study of the conditions under which a mutagen exercises its maximal effect is important in its own right. Firstly, such a study is indispensable for quantitative comparisons between mutagenic treatments. If *Drosophila* larvae, instead of adults, were the preferred object of mutation studies, X-rays would have been considered a much less effective mutagen than formaldehyde food; for larval germ cells, which respond strongly to the latter, have very low sensitivity to irradiation. Again, the fundamental dose-effect relations for X-rays would not have been established so readily if the oxygen content of air varied between localities and days; for the mutagenic efficiency of X-rays is markedly dependent on oxygen supply. Secondly, it appears that most or all mutagens, including ionizing radiations, produce at least part of their effect indirectly. Analysis of the conditions which favour or reduce the effectiveness of a given mutagen may disclose the existence and degree of an indirect effect and may suggest its nature. Thus, studies of the effect of visible light, temperature and nutrients on mutagenesis by ultra-violet light, and of the effect of oxygen,

temperature and protective substances on X-ray mutagenesis have influenced the theories of how these mutagens act. The production of mutations *via* digestion and metabolism is the most devious of all artificial means of mutagenesis, and its analysis must be correspondingly complicated. But since it is at least possible that a proportion of the so-called spontaneous mutations arise in a similar manner, such an analysis may contribute to an understanding of naturally arising mutations.

The following factors were found to affect formaldehyde mutagenesis and have been studied in more or less detail: variation in sensitivity amongst germ cells; effect of the larvae on the treated medium; storing of the treated medium without larvae; composition of the medium to which formaldehyde is added; supplementary chemical treatment; density of the larval population; individual differences between larvae; and strain of flies. It was found that these factors are not independent and that the action of several of them can be reduced to changes in the degree or distribution of sensitivity in the larval testis. Thus the sensitivity of the treated germ cells seems to be one of the key factors which determine the mutagenic effectiveness of a given concentration of formaldehyde in the food. It is also the factor which has been most thoroughly analysed, and the results have been published (AUERBACH and MOSER 1953a). The remaining factors are dealt with in the present paper.

Material and Methods

A wild-type strain, Oregon-K, was used for treatment in almost all experiments. Its spontaneous mutation rate to sex-linked lethals in the male has been determined at intervals throughout the last ten years; it fluctuates between 0.1 and 0.3%.

The preparation of formaldehyde food has been described previously (AUERBACH and MOSER 1953a). Concentrations of formaldehyde, as calculated on the basis of the water content of the medium, varied from 0.18 to 0.24%. In most experiments, the medium to which formaldehyde was added consisted of 3% agar, 10% killed brewer's yeast, and 10% dextrose in tap water. In some, "fortified" medium was used (12% maizemeal, 10% molasses, $8^1/_2$ killed yeast). Seeding with live yeast was omitted. Formaldehyde in the food suppresses the growth of visible colonies of micro-organisms for several days; usually these started to form only after the larvae had left the food for pupation. In the later experiments, 0.4% propionic acid was added to the food; this appears to suppress all noticeable types of microbial contamination.

Larvae for treatment were collected from watch glasses containing maizemeal-molasses medium (or, occasionally, agar painted with a mixture of alcohol and acetic acid), on which the parents had laid eggs for a period of three hours. The ages of the larvae are always given in hours from the middle of the egg-laying period.

The results reported below have been obtained in the course of many years, some of them in the earliest experiments with formaldehyde food. This explains differences in the genetical procedure. In all experiments, the percentage of sex-linked lethals, as determined by the Muller-5 technique, was taken as a measure of mutagenic success. In all later experiments, carried out after the importance of the brood pattern had been recognized, the following mating scheme was used.

Treated ♂♂ were mated individually to 2—3 ♀♀ each. After 3—4 days, the ♂♂ were given fresh ♀♀, and the first ♀♀ were allowed to produce offspring for another 3—4 days. At the end of this time, the ♂♂ were discarded and the second lot of ♀♀ were retained for another 3—4 days. In this way, mutation rate can be determined separately for sperm samples used during two successive periods of 3—4 days each. The ratio between the results in the first and second brood has been called the brood gradient; it is an indication of the sensitivity pattern of the testis at the time when the mutagen reached the gonads. In some of the earlier experiments, the same ♀♀ were used for both broods, and this obscures the brood pattern. In a few early experiments, only one brood was raised. This, as will become clear from the following, may yield misleading results; for the brood gradient is very sensitive to even slight changes in experimental conditions, and two types of treatment may differ not so much in their overall mutagenic success as in the way a given number of mutations is distributed over successive broods.

Results

I. Effect of the larvae on the treated medium

a) Mutations. Sensitivity to the mutagenic action of formaldehyde food is restricted wholly — or very nearly so — to the auxocyte stage, i.e. the growth stage of the primary spermatocyte prior to the onset of meiosis[1]. In the course of larval life the sensitivity pattern of the testis changes in conformity with the changes in number and distribution of auxocytes, and this is reflected in the changing brood pattern of mutation rates. Fig. 1 shows the result of two representative experiments. On each of the four days of larval life one batch of larvae was treated, and brood patterns were obtained by mating the treated ♂♂ to 2 fresh Muller-5 ♀♀ every 3 days. Treatment during the first day of larval life results in a positive effect in the oldest germ cells only, so that mutation rate is high in the first brood and subsequently falls off steeply. On the third and fourth days of larval life, the oldest testis cells are approaching meiosis and have passed the sensitive stage. Mutation rate after treatment on one of these days is low in the first

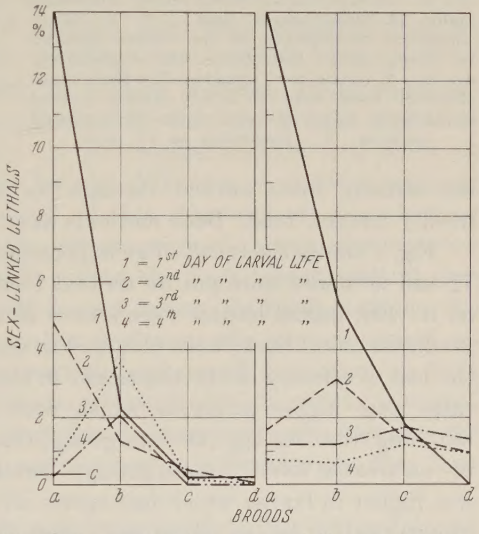


Fig. 1. The result of two representative experiments, showing mutation rates in successive broods after treatment of larvae of different ages

[1] This statement refers to larval medium containing formaldehyde. The pattern of sensitivity to formaldehyde injections into aduld ♂♂ is quite different, nature spermatozoa being the most sensitive stage. Although this has been emphasized repeatedly, it has been the cause of a certain amount of misunderstanding (e. g. Herskowitz 1954).

brood and reaches a peak in the second or third. Treatment on the second day results in an intermediate pattern which, depending on slight differences in developmental speed, may be more like a first-day or a third-day pattern.

The pattern is the same whether the larvae are allowed to complete development on treated food, or whether they are transferred back to normal food after 24 hours. This, at first sight, seems surprising; for flies which have spent their whole larval life on treated food would be expected to show a pattern of mutation rates such as would be obtained by the superimposition of the curves for the four days of treatment. Similarly, exposure during the first two days should give a superimposition of the first- and second-day curves, i.e. a high mutation rate in both the first and second broods. The lack of such superimposition of curves after prolonged treatment indicates that the food loses its mutagenic effect on the larvae in the course of an experiment. Comparisons of mutation rate patterns after exposure of varying lengths of time indicate that this loss is practically complete after one or two days.

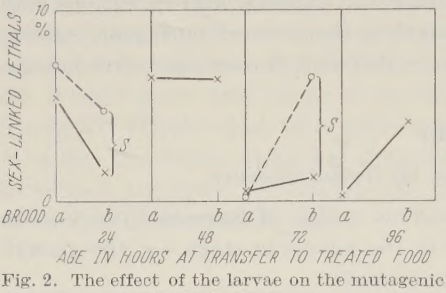


Fig. 2. The effect of the larvae on the mutagenic ability of formaldehyde food. ×——× larvae completed development on the treated medium to which they had been first transferred. o— — —o larvae were transferred to fresh formaldehyde food after 48 hours (young larvae) or 24 hours (older larvae) on the first treated medium. *S* = significant at 5 % level

This conclusion can be checked in two ways: firstly, larvae which have spent some time on treated food may be transferred to fresh treated food; this should result in an increased mutation rate in those cells which at the time of the second transfer were in the sensitive stage. Secondly, food which has already been worked through by larvae should be less mutagenic than freshly treated food. Both methods have been tried.

Fig. 2 shows the result of an experiment by the first method. Larvae of 24, 48, 72 and 96 hours were put on treated food and allowed to complete development on it. Sex-linked lethals were scored in the first two broods, and typical brood gradients (solid lines) were obtained in each series. These again give evidence for the loss of efficacy of the treatment in the course of an experiment; for mutation rates were higher in larvae which were subjected to treatment one day after hatching from the egg (48-hour group) than in larvae which had spent their whole life on treated food (24-hour group). Similarly, mutation rate in the second brood was higher in larvae which had spent only the last day on treated food (96-hour group) than in larvae which had spent the two last days of their life on treated food (72-hour group). When a sample of larvae from the 24-hour group was transferred to fresh treated medium at the beginning of the second instar, mutation rate was increased, particularly in those cells which at the time of the re-transfer had reached the sensitive stage, i.e. cells furnishing sperm for the second brood (broken line in Fig. 2, 24-hour group). Similarly, re-transfer of 72 hour larvae to freshly treated medium at the beginning of the fourth day resulted in an increase of mutation frequency in the second brood (broken line in Fig. 2, 72-hour group). Thus, fresh formaldehyde food can produce mutations in germ cells which would have failed to mutate with continued exposure to the old medium.

Two experiments were carried out by the second method. In both, survival rates and mutation frequencies were compared in flies which as 48-hour old larvae had been put either on freshly made formaldehyde food or on formaldehyde food which had previously been worked through by larvae from another, phenotypically distinguishable strain. Care was taken that the final number of larvae was the same in all vials. The experiments differed in the lenght of time during which the food was pre-worked by the first strain: 6 days in Expt. FF 41, and 2 in Expt. FF 69. This, as will be seen, has led to different results.

The data are set out in Table 1. Six days of pre-feeding in Expt. FF 41 reduced mutation frequency drastically in both broods. This however, is a much longer time of pre-feeding than occurs in an ordinary experiment before the larvae reach the second instar. Expt. FF 69 was designed to imitate closely what happens under these conditions. The larvae for pre-feeding were placed on treated medium soon after hatching from the egg, and the *bw* larvae to be tested for mutations were added 48 hours later after having reached the second instar on normal medium. Under these circumstances, the total frequency of mutations in the two broods remained unchanged by pre-feeding; it was 4.6% on pre-worked medium and 5.0% on fresh medium when allowance is made for the difference in relative numbers tested in the two broods. The only result of this short period of pre-feeding was a shift in the distribution of mutants. On pre-worked medium the majority of mutants occurred in the first brood, giving the high brood gradient characteristic for treatment during the early second instar. On fresh medium, the brood gradient was low, as is customary after treatment of a more advanced second instar. Thus, development on the partially exhausted food seems to have been delayed, so that the mutagenic effect was exercised on a somewhat "younger" testis than on fresh medium. This interpretation is borne out by the fact that the larvae on the pre-worked medium took one day longer to develop into flies than those on the fresh medium.

Table 1. *The effect of larval activity on toxicity and mutagenicity of formaldehyde food.* Age of larvae for lethal test 48 hours. 1 ♂ × 2 ♀♀. Brood interval 3 days

Expt.	Strain used for		Duration of pre-feeding in days	Survival	Mutation rate			
					first brood		second brood	
	pre-feeding	lethal test		%	*n*	%	*n*	%
FF 41	*vg*	Or-K	—	76	89	12.3	303	3.0
			6	81	316	2.5	237	0
FF 69	Or-K	*bw*	—	81	92	6.5	407	4.7
			2	86	90	12.2	476	3.4

Thus, food which is being worked through by larvae for a short time does not deteriorate sufficiently to loose its mutagenic ability for previously untreated larvae. This is in agreement with experiments carried out in Dr. J. M. Rendel's laboratory (personal communication). In these experiments fortified medium (see section on methods) to which formaldehyde had been added was worked through by ebony larvae for varying lengths of time before wild type larvae for mutation tests were transferred to it. Although the pre-worked medium gradually lost its mutagenic ability, the change became noticeable only from the 5th day onward. It seems, therefore, that in the course of an experiment with prolonged exposure the quick loss of mutagenic effect is due to an interaction of two causes:

(1) a slow deterioration of the medium, which for several days does not show up in previously untreated larvae, and (2) development of some kind of tolerance in treated larvae, which makes them incapable of responding to even slightly deteriorated formaldehyde medium, while freshly made medium still can affect them.

b) Survival. The situation is quite similar for the toxic effects of formaldehyde food on the treated larvae. Fig. 3 shows survival rates in three experiments in which treatment was started 24, 48, 72 and 96 hours after the egg laying period and continued through the remainder of larval life. In all three experiments, survival was significantly better in larvae which had started treatment soon after hatching than in those which had started it one day later. Thus, at the beginning of the second instar the food had lost its toxicity for larvae which had been reared on it during the first instar. Yet, as shown in Expt. FF 69, Table 1, treated medium which had been pre-worked by larvae for two days — the time occupied by the first instar on formaldehyde food — did not lose much of its toxicity for previously untreated larvae. Thus, treatment seems to make the larvae resistant to the toxic effects of a slightly deteriorated medium. This tolerance does not extend to fresh medium; for re-transfer of larvae to fresh formaldehyde food at the beginning of the second instar in Expt. FF 39 (Fig. 3) reduced survival rate to the level of second-day treatment.

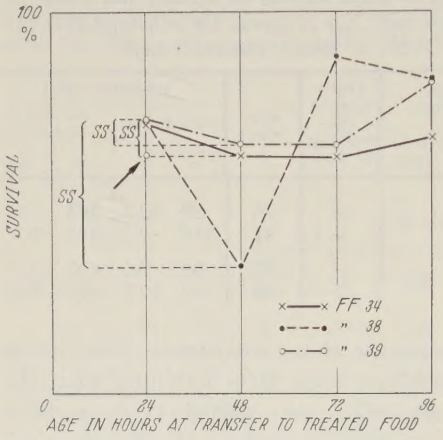


Fig. 3. The effect of the larvae on the toxicity of formaldehyde food. ↗° Survival rate, in Expt. FF 39, of larvae which at the beginning of the second instar had been retransferred to fresh formaldehyde food. *SS* = significant at 1 % level

c) Modifications. Finally, formaldehyde food which has been worked through by larvae loses its ability to induce phenotypic modifications in the emerging flies. Two main modifications have been observed: nicked wings and "bashed" eyes, i.e. eyes with an irregularly dented or depressed surface. The competence of eye and wing discs to react to the modificatory stimulus of the treatment varies with developmental stage. The curves relating frequency of modifications to larval age are different for the two phenotypes. This is shown in Fig. 4, in which the frequencies of modified flies have been plotted against the stage at which the larvae were transferred to the formaldehyde medium on which they spent the rest of the larval period. In all three experiments, the curve for bashed eyes differs noticeably and in the same way from that for nicked wings: the wing curve has a maximum in the middle of larval life, where the eye curve has a minimum.

In addition, there are differences between experiments. These must be attributed to the fact that developmental speed before and after treatment is not exactly the same in different experiments, so that larvae of the same chronological age may be developmentally slightly older or younger. In Fig. 4 the experiments have been arranged in what appears to have been the order of the

developmental ages of the larvae at the onset of treatment, those in FF 39 being the youngest. The justification for this seriation will appear below.

Wings. In FF 39, the competence to produce nicked wings started to appear on the second day, reached its maximum on the third, and fell off again on the fourth. In FF 38, competence was marked already on the second day and had ceased on the fourth. In FF 34, third-day larvae had already passed the sensitive stage. In all experiments, nicked wings were absent after treatment which had started soon after hatching from the egg, and in all experiments this absence of wing modifications was significantly different from the frequency of nicked wings during the period of maximum competence. Thus the ability of the treated medium to produce wing modifications had disappeared by the time first-instar larvae had reached the competent stage. Yet these larvae had remained competent to react to fresh formaldehyde medium; for re-transfer in Expt. FF 39 resulted in the appearance of flies with nicked wings. In Expts. FF 38 and FF 39, re-transfer of third-instar larvae to fresh formaldehyde food resulted in a significant *lowering* of the incidence of nicked wings. This unexpected finding cannot be interpreted without additional hypotheses, for which no proof is available. A possible explanation has been suggested to by Dr. Sobels. He found that the incidence of flies with abnormal abdomen in *fused* heterozygotes could be decreased by retarding development, presumably because this gives the affected imaginal discs a better chance for regulation. In the present experiments, retardation of development through prolonged treatment may have had a similar effect.

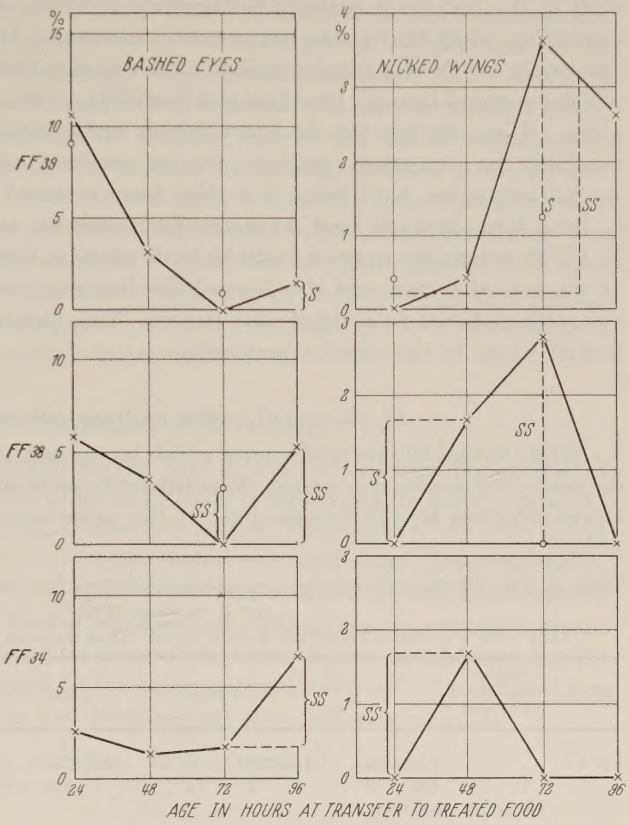


Fig. 4. The frequencies of modifications after treatment of larvae of different ages. o = frequency of modifications when the larvae had been re-transferred to fresh formaldehyde food after 48 hours (young larvae) or 24 hours (older larvae) on the first treated medium. *S* = significant at 5 % level, *SS* = significant at 1 % level

Eyes. The existence of two peaks for the induction of bashed eyes suggests that two different developmental disturbances are responsible. This is confirmed

by a closer study of the phenotypes; the majority of the early bashed eyes are indented dorsally, while the late bashed eyes are indented ventrally or in the centre. The earlier assumption that at all stages of transfer the larvae in Expts. FF 39, 38 and 34 were increasingly older in this order, explains the differences between experiments. From the youngest to the oldest larvae, there is a gradual shift in the curves, sensitivity to the early stimulus diminishing and finally disappearing, while that to the late stimulus increases. In all three experiments, the frequency of the late type of bashed eyes was significantly lower after treatment which extended through the third and fourth days than after fourth-day treatment alone. Thus, during the 24 hours which early third-instar larvae require for reaching the competent stage on treated medium, their ability to develop eye modifications has been lost. Yet they have retained their competence to react to fresh formaldehyde food, as shown by re-transfer in Expts. FF 38 and FF 39. In FF 39, retransfer to fresh formaldehyde medium was also done at the beginning of the second instar, and this *lowered* the frequency of the early type of bashed eye, although not to a significant degree. This parallels the similar finding for nicked wings in the same experiment.

II. Storing of treated medium without larvae

While formaldehyde medium on which larvae are reared gradually looses both its toxic and mutagenic action, formaldehyde medium which is stored without larvae becomes less mutagenic but, at the same time, more toxic.

Table 2. *The effect on survival, development and mutation frequency of storing formaldehyde-food for 6—7 days at 25° C*
(1 ♂ × 2 ♀♀. Brood interval 4 days in FF 63, 3 days in the other experiments)

Expt.	Strain and age of larvae		Food fresh	Food stored		*P*
FF 17	Or-K 48 hours	Survival	166/200 = 83%	130/200 = 65%	Diff. = 18%	0.001
		Days of eclosion	9 — 12	12 — 17	Delay = 3 days	
		Lethals in brood *a*	33/518 = 6.4%	27/604 = 4.5%	Ratio = 1.2	0.1
FF 41	Or-K 48 hours	Survival	227/300 = 76%	197/300 = 66%	Diff. = 10%	0.002
		Lethals in brood *a*	11/ 89 = 13.3%	19/416 = 4.6%	Ratio = 2.7	0.001
		brood *b*	9/303 = 3.0%	5/386 = 1.3%	Ratio = 2.3	
FF 63	Or-K 24 hours	Survival	647/720 = 90%	498/720 = 69%	Diff. = 21	0.001
		Days of eclosion	10 — 15	15 — 22	Delay = 5 days	
		Lethals in brood *a*	21/279 = 7.5%	20/536 = 3.7%	Ratio = 2.5	0.025
		brood *b*	12/419 = 2.9%	8/646 = 1.2%	Ratio = 2.4	
FF 60	*Cy L/ S Bl cn* 24 hours	Survival	107/240 = 45%	99/180 = 55%	Diff. = — 10	NS
		Days of eclosion	11 — 16	16 — 21	Delay = 5 days	
		Lethals in brood *a*	17/276 = 6.2%	9/512 = 1.8%	Ratio = 3.4	0.001
		brood *b*	14/407 = 3.4%	7/460 = 1.5%	Ratio = 2.2	

Note: In Expt. FF 63 0.4% propionic acid was added to the medium.

Table 2 presents data from four experiments in which survival, developmental rate, and frequency of sex-linked lethals were determined after treatment with formaldehyde medium which was used either fresh or after storage at 25° C for 6—7 days. In the first three experiments, with a wild-type strain, survival was very significantly lower on stored than on fresh medium. This, together with the marked developmental delay in two experiments in which dates of eclosion had been noted, was taken as measure of the increase in toxicity with storage. In the fourth experiment, for which a multiply marked strain was used, the survival rate was not affected by storing, but there was a pronounced developmental delay, showing that the stored medium had become more toxic. In all experiments, mutation rate in the first brood was lowered by storing, in three of them significantly so. In these three experiments second broods had been reared in order to test for the possibility that the decrease in mutation rate in the first brood was made good by an increase in the second. The fact that mutation rates in the second broods were depressed to about the same extent as in the first shows that storing had resulted, not in a shift in the brood pattern of mutation rates, but in a genuine reduction of the mutagenic ability of the medium.

III. Composition of the medium

Early in the work with formaldehyde food it was realized that the success of treatment with a given amount of formaldehyde is influenced by the composition of the medium to which the formaldehyde is added. In general it has been found that richer media give better survival and higher mutation rates. This was also so in unpublished experiments by A. Robertson and J. Rendel, which the authors kindly permit me to quote. An enhancement of mutation rates is brought about by enrichment of the food with protein or with sugar. In one of the early experiments, parent flies were allowed to lay eggs on three different types of medium to which 0.18% formaldehyde had been added. The media contained:

A about 12% maizemeal, 10% molasses, 8% yeast,
B 3.5% dextrose, 8% yeast,
C 8% yeast.

Whereas many healthy flies were produced on *A* and *B*, the *C* bottles yielded only a few, puny flies after a developmental delay of several days. The frequencies of sex-linked lethals were: 8.2% on *A*, 5.5% on *B*, and 0/345 on *C*, all differences being statistically significant. In the light of later results it was realized that mutation rates in this experiment might have been influenced by uncontrolled differences in number of eggs laid, number of larvae hatched, time distribution of hatching larvae, and the proportion of spermatozoa which had been treated during the sensitive auxocyte stage. In two subsequent experiments, the first sources of error were avoided by stocking the treated media with counted numbers of larvae of the same age, and differences in sensitivity during treatment were reduced by testing only offspring which had been produced during the first 5—6 days. The results, as summarized in Table 3, show that also under these conditions starvation of protein and, even more, of sugar, reduced the survival rate, and that drastic changes in survival were accompanied by decreases in mutation frequency.

A different result was obtained when Expt. FF 17 was repeated with 24-hour old larvae, comparing only the first and the last type of medium, i.e. medium with and without 10% dextrose. The omission of dextrose retarded development slightly and reduced survival rate to about one third — from 90% to 32% —, but mutation frequency among flies emerging during the first three days was even

Table 3. *Influence of the composition of the food on toxicity and mutagenicity of a given concentration* (0.18%) *of formaldehyde.* 200 larvae, 48 hours old, per vial S = sign at 5% level. SS = sign at 1% level

Expt.	Medium contains		Speed of development	Survival (out of 200)	Sex-linked lethals	
	yeast %	dextrose %			chromosomes No	%
FF 13	8	8	standard	118 SS	114	5.5
	4	8	retarded	SS 68	132	3.6
	8	0	retarded	46	115	2.7
FF 17	10	10	standard	166	528	6.4
	15	10	2 days' delay	SS 158	607	S 6.4
	10	0	2 days' delay	58	492	3.5

higher on sugar-free medium. The difference was, however, statistically not significant and disappeared largely when the data from the second brood, produced from the third to the sixth day, were included in the comparison. Thus, under the conditions of this experiment, the result of sugar starvation was not an overall reduction in mutation frequency, but a shift of mutations from the second to the first brood.

IV. Supplementary chemical treatment

Hydrogen peroxide. In two experiments, formaldehyde and hydrogen peroxide were added to the medium in the relative amounts which had given much higher mutation rates than formaldehyde alone in experiments with *Neurospora* (DICKEY et al. 1949, JENSEN et al. 1951). The effectiveness of this mixture has been attributed to the formation of a mutagenic peroxide. Although it was thought unlikely that the same or a similarly effective peroxide would be formed in *Drosophila* food or, if formed, would reach the chromosomes in the germ cells, the actual result was nevertheless unexpected. In both experiments the addition of hydrogen peroxide reduced the mutagenic effect of formaldehyde food to about half its value. The data are set out in Table 4.

Table 4. *The effect of hydrogen peroxyde on the toxicity and mutagenicity of formaldehyde food.* Age of treated larvae 48 hours. First brood produced during first 5 days; second brood produced during the next 5 days after removal of the ♂♂

Expt.	% CH_2O	% H_2O_2	Survival (out of 200)	Sex-linked lethals			
				first brood		second brood	
				n	%	n	%
FF 36	0,18	—	146	158	7.0	162	4.3
	0,18	0.14	38	469	3.8	257	2.3
	—	0.14	3	not tested			
FF 37	0.18	—	100	220	8.1	91	7.6
	0.18	0.14	64	509	4.7	279	4.0

It can be seen from the table that hydrogen peroxide by itself was highly toxic, and that its toxicity was reduced by the simultaneous presence of formaldehyde in the food. The mixture was, however, still much more toxic than formaldehyde alone; this was shown not only by the significantly lower survival rate, but also by a pronounced delay in development on food containing both chemicals as compared with formaldehyde food. In both broods of both experiments mutation rate after treatment with the formaldehyde-peroxide mixture was about half that produced by formaldehyde alone. Although the sample of tested chromosomes in each brood was by itself too small to make the individual differences significant, the pooled χ^2 for all four comparisons is about 8 for 1 D.F., giving a probability of 0.5% for the result having been due to chance. Although storing of treated spermatozoa in ♀♀ does not usually result in a drop of mutation frequency, mutation rate dropped noticeably from the first to the second brood in both series of Expt. FF 36; presumably the ♂♂ had mated several times before they were removed, and the spermatozoa for the second brood came mainly from the later matings. This was fortunate, for it was thus possible to show that admixture of hydrogen peroxide to formaldehyde food had resulted in a genuine lowering of mutation rate and not in a shift of mutations from the first to the second brood.

2-4-dinitrophenol. It seemed possible that the composition of the medium might affect the formaldehyde-induced mutation rate *via* the metabolic rate of the treated larvae. Chemicals which alter metabolic rate might then influence the result of mutation tests with formaldehyde food. 24-hour old larvae were placed on medium with or without formaldehyde in bottles containing small open vials

Table 5. *The effect of dinitrophenol on toxicity and mutagenicity of formaldehyde food.* 1 ♂ × 3 ♀♀. Brood interval 4 days

Medium contains		Survival (out of 150)	Development	Sex-linked lethals			
				first brood		second brood	
CH_2O	DNP			*n*	%	*n*	%
—	—	133	standard	not tested			
—	+	127	slightly speeded up	not tested			
0.18%	—	SS< 126	3 days' delay	311	5.1	128	0
0.18%	+	SS< 101	5 days' delay	410	5.1 [1]	164	2.4

[1] plus 5 semi-lethals and one sex-linked visible. SS = sign at 1% level.

with dinitrophenol crystals. Equal numbers of larvae of the same age and from the same parent culture were placed in comparable bottles without dinitrophenol crystals. Development on untreated medium was speeded up slightly by dinitrophenol in the atmosphere. On treated medium the influence of dinitrophenol on development was very strong, the peak of eclosion occurring two days in advance of bottles without dinitrophenol. The emerging ♂♂ were mated individually to 3 ♀♀ each, and a second brood was obtained by re-mating the ♂♂ to fresh ♀♀ on the fourth day. The results are summarised in Table 5.

Thus, in contrast to the experiment with hydrogen peroxide, decreased survival was here not accompanied by reduction in mutation frequency. One noticeable difference between the effects of the two supplementary treatments was that

hydrogen peroxide resulted in delayed, while dinitrophenol in speeded-up development. In order to test whether this was the cause of their different effects on formaldehyde-induced mutation rate, the dinitrophenol experiment was repeated. This time, dinitrophenol took no effect on either survival or speed of development; but since eclosion was spread over 10 days in all bottles, whether or not they contained dinitrophenol, a comparison between early and late hatchers could be carried out in both series. The result is shown in Table 6.

Table 6. (Expt. FD 4). *The influence of speed of development on formaldehyde-induced mutation rate.* Age of larvae 24 hours. 1 ♂ × 2 ♀♀; brood interval 3 days

Food contains	Day of eclosion	Sex-linked lethals			
		first brood		second brood	
		n	%	*n*	%
CH_2O	2nd	161	8.1 > SS	259	3.5
CH_2O	8th — 11th	189	1.1	169	1.8
CH_2O – DNP	2nd	228	7.9	305	1.6
CH_2O + DNP	8th — 11th	167	3.6	162	0

SS = sign at 1% level.

It is clear that in both series the late hatchers have fewer mutations than the early ones. For formaldehyde treatment alone, the difference is highly significant; for the combined treatment it is in the same direction, though not significant by itself.

In experiments by Herskowitz (1954) the addition of dinitrophenol to the medium did not affect the production of mutations by formaldehyde; data on survival and developmental speed are not given, so that a comparison with the present results is not possible.

V. Population density during treatment

The number of larvae reared on a limited amount of formaldehyde food may be expected to influence the outcome of mutation tests, but it is difficult to predict in which direction. In a crowded vial, the larvae ingest less of the treated medium, and this should result in fewer mutations. Starvation in crowded vials might reduce mutation rate even further (see Section III). On the other hand, a smaller amount of ingested formaldehyde would be less toxic and this might increase mutation rate (see Table 8). Population density might also influence the changes which the medium undergoes as a result of larval activity. Gordon and Sang (1942) have shown this to be so for yeasted medium; the formaldehyde medium did not allow visible growth of micro-organisms, but some bacterial growth may have remained undetected. Finally, nutrition during early larval stages might influence the development of the sensitivity pattern in the testis, and this would be reflected in a change of the brood pattern of mutation frequencies.

In experiments with second-instar larvae it was this last effect which determined the influence of crowding on mutation tests with formaldehyde. This is illustrated in Fig. 5, in which shaded columns represent crowded cultures (50—80 larvae in about 6 cc of food), while the empty ones represent thinly populated vials (10 larvae). At first sight, the results appear contradictory. Crowding increased mutation rate in the first brood in two experiments (top row) and decreased it in the other two; but if, instead of concentrating on this one comparison,

all of the results are considered together, the situation becomes clearer. It will then be seen that an increased mutation rate in the first brood was always accompanied by a decreased one in the second, and *vice versa*. Expressed differently, crowding had influenced, not the total number of induced mutations — this was hardly affected — but the brood pattern. The last column expresses this result by means of the brood gradient, i.e. the ratio of mutation frequency in the first brood to that in the second. In the two experiments in the top row, crowding has increased the brood gradient, in the two experiments in the bottom row it has decreased it. Since development of the testis during the second instar is accompanied by a gradual decrease in brood gradient (Auerbach and Moser 1953a),

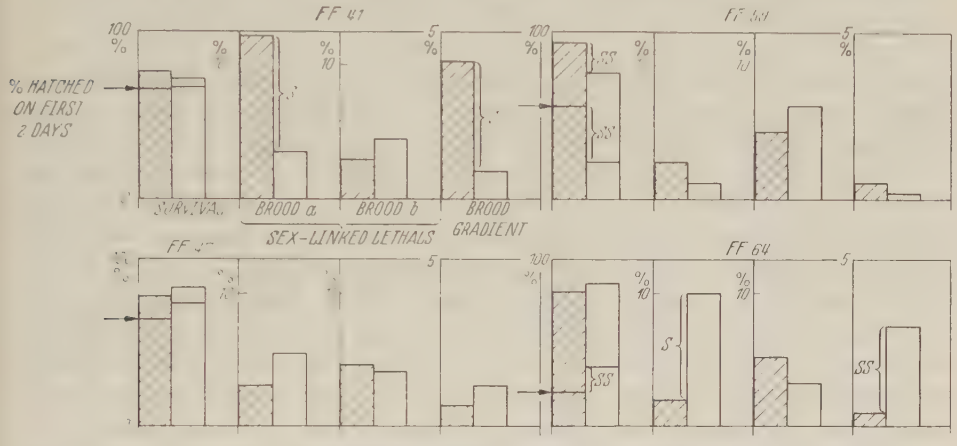


Fig. 5. Effect of population density on the mutagenic effect of formaldehyde food. Shaded columns: 50—80 larvae per vial; empty columns: 10 larvae per vial. S = significant at 5 % level; SS = significant at 1 % level

it appears that in two experiments crowding had speeded up development, while in the other two it had retarded it. In three of the four experiments, this interpretation is supported by a comparison between the proportion of flies hatching on the first day from overcrowded and undercrowded vials (first column). In the fourth experiment, the two series did not differ in this respect. Survival rates followed the developmental age during treatment. In conformity with the findings in Section I, whichever series was developmentally "younger", had a higher survival rate: the crowded series in the two experiments in the top row, the thinly populated one in the two other experiments.

Why crowding should have had such opposite effects in different experiments, it is difficult to decide. Obviously, the balance between a speeding-up of development, caused by an increase in the amount of ingested food, and a retardation of development, caused by an increase in the amount of ingested formaldehyde is easily changed in one or the other direction by slight differences in initial food composition, rate and kind of processes which change the food, and age of the larvae.

The second instar is a stage of transition from the early to the late sensitivity pattern of the testis (Auerbach and Moser 1953a). The pattern is very labile at this stage, and it is therefore not surprising that the main effect of population

density on 48-hour larvae should be a shift in the brood pattern of mutation rates. At stages with a more stable sensitivity pattern, a more general effect of crowding on mutation rate might become apparent. In one small-scale experiment with 24-hour larvae crowding seems to have depressed the overall frequency of mutations; but the data were not statistically significant, and the problem has not been followed up.

VI. Individual differences between larvae

A priori the induction of mutations by the feeding method would be expected to result in heterogeneity between individuals. The first two tests for heterogeneity did, in fact, confirm this suspicion (AUERBACH and MOSER 1953a). But the experiments used for these tests had been selected because superficial inspection of the data suggested heterogeneity. Meanwhile 10 more unselected experiments have been analyzed for heterogeneity. In two of them the ordinary χ^2 method gave significant levels of deviation from randomness; for the remaining 8 experiments the test gave a negative result. Thus, altogether 4 out of 12 experiments showed significant heterogeneity between individual mutation frequencies. Even for these four experiments, the significance of the deviation from randomness was greatly reduced or abolished when HALDANE's (1944) method for small numbers was applied. It thus appears that individual differences between larvae can, in general, be neglected in the evaluation of mutation experiments with formaldehyde food. It should be added that for the statistical analysis mutation rates from the first two broods had been pooled so that individual differences in the brood pattern of mutations, i.e. in developmental speed, would be evened out.

VII. Differences between strains

The experiments with different media (Section III) and with supplementary chemicals (Section IV) had indicated that formaldehyde-induced mutation rate is depressed when development is slowed down. A comparison was therefore carried out between the Or-K strain and a vestigial strain, since it was known from HARNLY's (1929) work that the *vg* gene slightly prolongs larval development. On formaldehyde food, flies from the *vg* strain emerged 2—3 days later than those from the Or-K strain. Two experiments were carried out. Survival rate of the treated larvae and sex-linked mutations in two successive broods were scored in both experiments. In one of them, dominant lethality was estimated from the number of F_1 eggs hatching. This, as shown in a previous publication (AUERBACH and MOSER 1953b), gives only a rough indication of true dominant lethality. The results are set out in Table 7.

As expected, *vg* flies had fewer dominant and recessive lethals induced in them than Or-K flies; but the picture is complicated in several ways. In Expt. FF 41, the 48 hours old vestigial larvae suffered unusually heavily from the toxic effects of the treatment, and this may have contributed to their very low mutation rate. In Expt. FF 43, 48-hour old *vg* larvae stood the treatment fairly well, and their mutation rate was much less reduced in comparison with that of the Or-K strain. Further, the brood pattern of the 24 hour old vestigial flies in Expt. FF 43 was unusual for this stage and different from that of the simultaneously and similarly treated Or-K flies. In the latter, the brood gradient was very steep; this was not

Table 7. *Comparison between the effects of formaldehyde food on two different strains.* 40—50 larvae per vial. 1 ♂ × 2 ♀♀. Brood interval 3 days

Expt.	Strain	Age of larvae (hours)	% survival (out of 300)	% domin. lethals	Sex-linked lethals			
					first brood		second brood	
					n	%	*n*	%
FF 41	Or-K	48	76		89	12.3	303	3.0
	vg	48	24		200	2.0	294	0.3
	vg	24	87		130	10.7	298	3.0
FF 43	Or-K	48	93	74	172	5.2	465	2.8
	vg	48	86	43	536	3.1	480	1.0
	Or-K	24	93	81	490	4.9	504	0.6
	vg	24	78	31	483	2.9	522	2.9

unexpected, for in this experiment, unlike most others, the 24-hour larvae were picked directly from agar lids on which the parent flies had deposited their eggs. This procedure, as shown previously (Auerbach and Moser 1953a), results in a testis in which only the very oldest cells have reached the sensitive stage. The fact that the same procedure of collection applied to *vg* larvae resulted in a brood gradient of 1 suggests differences between the two strains in either the development of the sensitivity pattern or the rate of sperm utilization. Herskowitz and Abrahamson (1955) in reporting an apparent strain difference in sensitivity to formaldehyde food, state that different rates of sperm utilization may conceivably account for it.

That differences in speed of larval development do not necessarily result in altered mutational response to formaldehyde food was shown by a comparison between two strains which differed only in the presence or absence of a Minute gene in heterozygous condition. Development of the Minute flies took two days longer than that of the non-Minute ones; yet mutation rate was not significantly different between the strains and was, in fact, slightly higher in the Minute one.

Discussion

Widely different conditions and supplementary treatments have been found to impair the mutagenic effectiveness of formaldehyde food; but many of them appear to achieve this result in the same indirect way by increasing the toxic effects of the treatment. The negative correlation between the frequency of induced mutations and toxicity as measured by mortality and retarded development of the treated larvae is apparent from Table 8, in which the relevant data from the various sections of this paper have been collected in abbreviated form.

The most obvious interpretation is that selection removes the most heavily affected larvae which presumably would have had the greatest number of mutations in their germ cells. Although some degree of selection may take place among the 48-hour larvae, which are particularly susceptible to the toxic effect of the treatment (Section I), this is hardly the whole explanation; for it presupposes a marked heterogeneity between individuals, and this is not borne out by the results reported in Section VI.

An alternative cause for the negative correlation between toxicity and mutagenicity of the medium is retarded development on the more toxic media. In most

Table 8. *The relation between survival rate, developmental speed and induced mutation frequency on formaldehyde medium*

S = sign at 5% level. SS = sign at 1% level

Expt.	Age of larvae (hours)	Type of additional treatment	Speed of development	Survival rate (%)	Mutation rate brood *a*	brood *b*	*a* / *b*
FF 13	48	control[1]		59 > SS	5.5	—	
		less yeast	retarded	34 > SS	3.6	—	
		no sugar	retarded	23	2.7	—	
FF 17	28	control		83	6.4	—	
		less yeast	2 days' delay	79 > SS	SS < 6.4	—	
		no sugar	2 days' delay	29	3.5	—	
FF 36	48	control		73 > SS	7.0[2]	4.3[2]	1.6
		H_2O_2 in medium	retarded	19	3.8[2]	2.3[2]	1.7
FF 37	48	control		50 > SS	8.1	7.6	1.1
		H_2O_2 in medium	retarded	32	4.7	4.0	1.2
FF 17	48	control		83 > SS	6.4	—	
		food stored 6 days	3 days' delay	65	4.5	—	
FF 41	48	control		76 > SS	SS < 12.3	3.0	4.1
		food stored 6 days	not recorded	66	4.6	1.3	3.5
FF 63	24	control		90 > SS	SS < 7.5	3.7	2.0
		food stored 7 days	5 days' delay	69	2.9	1.2	2.5
FF 60	24	control		45	SS < 6.2	3.4	1.6
		food stored 6 days	6 days' delay	55	1.8	1.5	1.2
FD 2	24	control		84 > SS	5.1	0/128	
		dinitrophenol in air	2 days' gain	68	5.1	2.4	
FD 4 controls	24	no additional treatment	first hatchers	60	SS < 8.1	3.5	2.3
			6—9 days' delay		1.1	1.8	0.6
FD 4 treated	24	dinotrophenol in air	first hatchers	65	7.9	1.6	
			6—9 days' delay		3.6	0/162	

[1] The controls in these experiments were raised on the usual formaldehyde medium.
[2] Combined difference for all four comparisons SS.

experiments with 48-hour old larvae decreased survival rate and retarded development parallel each other, so that it is not possible to decide which of them is more important. In experiments with younger larvae, however, developmental delay appears to be the decisive factor which depresses mutation rate. This can be seen from the last four experiments, in which the parallelism between survival and developmental rate broke down. In Expt. FF 60, survival rate was the same in both series, so that the highly significant reduction in mutation rate on stored medium cannot be explained by selection and is more probably connected with the very marked developmental retardation. By analogy it seems likely that also in Expt. FF 63 developmental delay rather than selection determined the decreased mutation frequency on stored medium. In Expt. FD 2, the presence of dinitrophenol in the air significantly decreased survival rate, so that selection was given a chance of weeding out the more heavily affected larvae. Yet mutation rate was not depressed and this parallels the fact that developmental rate, instead of being slowed down, was speeded up. Finally within both the control and treated series of Expt. FD 4 early hatchers had a higher mutation frequency than

late ones, the difference being highly significant in the control series. Thus, when treatment starts soon after hatching from the egg, all conditions which prolong developmental time appear to lower the formaldehyde induced mutation frequency.

Developmental rate might influence the genetical efficacy of formaldehyde food on three levels. Differences in digestive and metabolic processes may determine the amount of active mutagen which penetrates to the chromosomes. Differences in the rate at which new chromosome material is synthesized may affect the sensitivity of these synthetic processes to disturbing chemical influences. And finally, metabolic processes may affect the proportion of primary genetical lesions which do not undergo repair. The present data furnish no basis for distinguishing between these possibilities.

They show, however, that at least a portion of the interaction between developmental speed and formaldehyde mutagenesis occurs at the biological rather than the biochemical level. This appears from a comparison of brood gradients in contrasted series of the same experiment (last column of Table 8). It will be seen that in most experiments the brood gradient was unaffected by the conditions which decreased mutation rate: thus these conditions had left the sensitivity pattern of the testis unchanged. An exception is the control series of Expt. FD 4; here the late hatchers differ from the early ones not only in overall mutation frequency, but also in brood gradient. Whereas the brood gradient of the early hatchers is that expected after treatment of 24-hour old larvae, that of the late hatchers has the low value typical for older larvae. This suggests that the late hatchers took a long time to develop because their food intake was low, and that an effective concentration of mutagen in their testis was built up only when the food had already lost part of its strength (Section I). A similar, but statistically not significant difference in brood gradient between the low and high mutation rate series is found in Expt. FF 60.

The concentration of formaldehyde is in itself a factor which influences toxicity and, through this, mutagenic effectiveness of the medium. This was shown in experiments by ALDERSON (1954) in which mutation rate in the first two broods was plotted against concentration of formaldehyde in the food[1]. Treatment was given to newly hatched larvae. With the author's permission, his graph is here reproduced with the addition of a dose-effect curve for overall mutation rate (Fig. 6). It will be seen that the latter curve resembles the dose-effect curve for UV mutagenesis in having a maximum; but whereas the shape of the UV curve is due to heterogeneity between treated cells in resistance or degree of exposure, that of the formaldehyde curve is caused by the fact that treatment itself influences the number of cells on which it can act effectively. At higher concentrations mutation frequency in the first brood levels off, presumably through saturation of the sensitive cells, while that in the second brood declines steadily, resulting in the high brood gradient characteristic for very young larvae in which only the most advanced portion of the testis contains sensitive cells. It seems that, with the method used by ALDERSON, the full effect of treatment with

[1] Mutation rates in ALDERSON's experiments were as a rule higher than those obtained in the present experiments with similar concentrations of formaldehyde. This is attributable to differences in the methods of preparing medium and collecting larvae.

high doses was completed before the testis of the treated larvae had had time to develop the sensitivity pattern which was acted upon by the lower concentrations. Enough has been said about the ease with which slight differences in the treated larvae or in the procedure of treatment can alter mutation frequency and brood pattern to make it evident that the precise shape of Alderson's curve may not be repeatable with a different strain or a different method of treatment; but his findings emphasize once more the need to take account of the brood pattern in quantitative comparisons between mutagenic treatments.

This is brought out even more clearly by the experiments reported in Section V. It was shown there that crowding of 48-hour larvae on formaldehyde medium may shift the brood pattern in opposite directions, depending presumably on slight differences in developmental rate before and during treatment or in the rate at which the medium changes under the influence of the larvae. It is now generally recognised that quantitative comparisons between mutagens must be based on data from the same treated cell stage; but in a case like this, even comparisons between first broods may give entirely misleading results. Overall mutation frequencies are here a better measure of mutagenic effect, provided the different testis zones are represented in the same relative frequencies in the two series to be compared; but really trustworthy results can be obtained only from complete brood curves of mutation frequencies. Without this precaution, no conclusions can be drawn from differences in mutation frequencies between experiments (like those reported by Herskowitz 1954) in which population density was not controlled. It may be objected that complications through differences in the sensitivity pattern of the testis can arise only with larval treatment, especially by the feeding method. This is true to some extent; but it neglects the possibility, emphasized by Fahmy and Fahmy (1955), that differences in pre-treatment development and in rate of sperm utilization may affect the brood pattern also when imagines are treated. Altogether, it may well be that chemical mutagenesis by any method is a highly complex process, dependent on many interacting processes in the living organism or the treated germ cell, and that the complexities of the feeding method are only more obvious because they occur at a more easily analysable level.

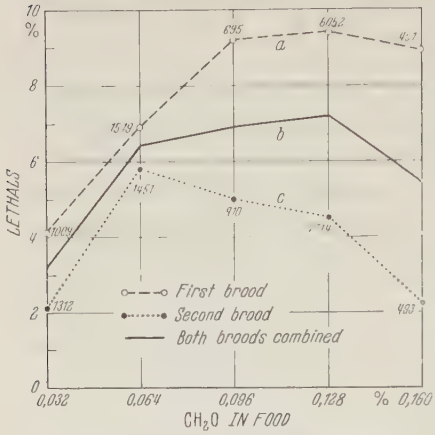


Fig. 6. Mutation frequencies produced by different concentrations of formaldehyde in the food (modified from Alderson 1954). Numbers refer do tested cultures

One complication which is peculiar to experiments by the feeding method is the interaction between the medium and the organisms feeding on it. It has been shown in Section I that both the medium and the larvae are affected by the treatment, the former losing its efficacy and the latter their responsiveness. This applies not only to mutations, but also to the production of modifications and has to be taken account of in phenocopy experiments.

The analysis of the way in which the efficacy of formaldehyde food changes in the presence and in the absence of larvae removes the discrepancy between some data obtained by Herskowitz (1954) and by the author (1951, 1952). Bathing of eggs in solutions of formaldehyde failed to produce mutations in experiments by the author. Herskowitz added formaldehyde on top of a medium on which flies had previously deposited eggs and on which the larvae subsequently developed. Under these conditions one would in any case expect to obtain mutations from the young larvae which ingested treated medium. Whether or not the mutations which actually occurred included in addition some which had been induced in the embryo cannot be decided by this method. The one positive result which the present author obtained by the egg-bathing method was also most plausibly attributed to early larvae feeding, as has been explained in some detail in the quoted papers.

In view of the high sensitivity of formaldehyde mutagenesis to physiological conditions the existence of strain differences in mutagenic response is not surprising. The experiments reported in Section VII suggest that differences in the sensitivity pattern of the testis may be involved also here; but differences in food intake and digestive and metabolic processes are also likely to play a rôle. It is more surprising that heterogeneity between individual larvae is, on the whole, negligibly small. This is in marked contrast to the extreme heterogeneity in experiments with pyronin feeding (Auerbach 1955) and indicates that it is not differences in the amount of food intake which determine the unequal response to pyronine food.

A similarity between the mechanism of spontaneous mutation and mutagenesis by formaldehyde food has been suggested by the similar distribution of these two kinds of mutation over successive progenies from ♂♂ or ♀♀ (Auerbach 1951). The present data lend some support to this idea. Formaldehyde induced mutation rate, like spontaneous mutation rate (Olenov 1939, 1941, Singh 1940), is reduced when larval development is prolonged. (See, however, the contrasting result by Child 1946.) Mutations which arose in ♂♂ under the influence of a mutator gene (Ives 1950) occurred mainly among spermatozoa used during the first week of sexual activity. A genetical condition, presumably a modifying gene, increased the effect of the mutator gene by extending the sensitive zone in the testis. Similarly, Lamy (1947) found that the presence of major mutations increased mutation rate by shifting the stage at which spontaneous mutations occur. It is attractive to think that spontaneous mutation rate may be regulated not only by control of mutagenic and anti-mutagenic substances, but also by genetically directed changes in the sensitivity pattern of the gonads to these substances.

Summary

The frequency of mutations which is induced by a given concentration of formaldehyde in the medium was found to depend on the following factors:

1. Interaction between the larvae and the medium. In the course of one or two days the medium loses its mutagenic effect on larvae which have been reared on it. This is due to (a) slow deterioration of the medium and (b) reduced response of the treated germ cells. Treated larvae which are transferred to fresh formaldehyde medium regain some of their ability to respond to the treatment, and

medium which has ceased to act on larvae reared on it can still affect previously untreated larvae. The toxicity of the medium and its ability to produce modifications in the treated animals are quickly destroyed by the activity of the larvae, and this may influence the results of experiments on phenocopy production.

2. Storing of formaldehyde medium without larvae. Storing for 6—7 days at 25° C resulted in increased toxicity and decreased mutagenicity.

3. Composition of the medium. Reduction of yeast or sugar decreased mutation rate in 48-hour old larvae. In one experiment with younger larvae omission of sugar shifted the brood pattern of mutations without reducing overall frequency.

4. Supplementary chemical treatment.

(a) The addition of hydrogen peroxide to the medium increased toxicity and decreased mutagenicity.

(b) The presence of dinitrophenol vapour in the air was ineffective in one experiment, and only slightly effect in another. These experiments, however, allowed to draw a comparison between early and late hatchers from the same bottles. Independent of the presence or absence of dinitrophenol, late hatchers had markedly lower mutation rates than early hatchers.

5. Population density during treatment. In experiments on 48-hour old larvae overall mutation rate was not affected by overcrowding in the treatment vials. Crowding did, however, affect the sensitivity pattern of the testis, so that mutations were shifted between successive broods. The direction of this shift varied between experiments, depending presumably on slight variations in developmental speed of the larvae before and after treatment.

6. Individual differences between larvae. Only 4 out of 12 statistically analysed experiments gave indications of heterogeneity between larvae.

7. Strain differences. A vestigial strain was found to differ from Or-K in mutation rate and brood pattern. This was thought to be related to the slower development of vestigial larvae; but the presence of Minute in one of two otherwise isogenic strains did not affect mutation rate or brood pattern.

It is shown that the cause which underlies most of these effects is a negative correlation between mutagenicity and toxicity of the medium. For older larvae this may be partly due to a more stringent selection on more toxic media; but for young larvae the decisive factor is retarded development. In at least one case developmental delay acted by shifting the sensitivity pattern of the testis. The great importance of the sensitivity pattern for the evaluation of experiments with chemical mutagens is stressed. Certain parallels between formaldehyde mutagenesis and spontaneous mutation are pointed out, and ist is suggested that spontaneous mutation rates may in part be controlled by genetically determined differences in the sensitivity pattern of the gonads to naturally occurring mutagens.

Although the present analysis shows that the brood pattern of mutation rates is easily influenced by environmental or physiological factors, it gives no cause for revising previously established conclusions on the sensitivity pattern of the testis, i. e. on the highly preferential sensitivity of early auxocytes. On the contrary, it provides an explanation for results obtained by Herskowitz which were throught to be incompatible with this pattern.

Literature

Alderson, T.: A biochemical study of the mutagenic action of formaldehyde in *Drosophila melanogaster*. Ph. D. Thesis, Univ. Edinburgh 1954. — Auerbach, C.: Some recent results with chemical mutagens. Hereditas (Lund) **37** (1951). — Mutation test on *Drosophila melanogaster* with aqueous solutions of formaldehyde. Amer. Naturalist **86**, 330 (1952). — The mutagenic action of pyronin-B. Amer. Naturalist **89**, 241 (1955). — Auerbach, C., and H. Moser: An analysis of the mutagenic action of formaldehyde food. I. Sensitivity of *Drosophila* germ cells. Z. Vererbungslehre **85**, 479 (1953a). — II. The mutagenic potentialities of the treatment. Z. Vererbungslehre **85**, 547 (1953b). — Child, G. P.: The effect of delaying time on mutation rate. Genetics **31**, 214 (1946). — Dickey, F. H., G. H. Cleland and C. Lotz: The rôle of organic peroxides in the induction of mutations. Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. **35**, 581 (1949). — Fahmy, O. G., and J. Myrtle: Cytogenetic analysis of the action of carcinogens and tumour inhibitors in *Drosophila melanogaster*. IV. The cell stage during spermatogenesis and the induction of intra- and inter-genic mutations by 2:4:6-tri(ethyleneimino)-1:3:5-triazine. J. Genet. **53**, 563 (1955). — Gordon, C., and J. H. Sang: The relation between nutrition and exhibition of the gene antennaless *(Drosophila melanogaster)*. Proc. Roy. Soc. Lond. Ser. B **130**, 151 (1941). — Haldane, J. B. S.: The mean and variance of χ^2 when used as a test of homogeneity when expectations are small. Biometrika (Lond.) **31**, 346 (1944). — Harnly, M. H.: An experimental study of environmental factors in selection and population. J. of Exper. Zool. **53**, 141 (1929). — Herskowitz, I. H.: Mutation rate in *Drosophila melanogaster* males treated with formaldehyde and 2,4-dinitrophenol. Genetics **36**, 554 (1951). — The mutagenicity of formaldehyde in different early developmental stages of *D. melanogaster* males. Amer. Naturalist **88**, 45 (1954). — Herskowitz, I. H., and S. Abrahamson: Differences in mutability of stocks of *Drosophila* with formaldehyde feeding. DIS **29**, 124 (1955). — Ives, P. T.: The importance of mutation rate genes in evolution. Evolution **4**, 236 (1950). — Jensen, K. A., I. Kirk, G. Kølmark and M. Westergaard: Chemically induced mutations in *Neurospora*. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. **16**, 245 (1951). — Lamy, R.: Observed spontaneous mutation rates in relation to experimental technique. J. Genet. **48**, 223 (1947). — Olenov, J. M.: New data on spontaneous mutation. Nature (Lond.) **143**, 858 (1939). — The mutational process in *Drosophila melanogaster* under avitaminous B_2 conditions. Amer. Naturalist **75**, 580 (1941). — Singh, R. B.: The influence of age and prolongation of larval life on the occurrence of spontaneous mutations in *Drosophila*. Ph. D. Thesis Univ. Edinburgh 1940.

Acknowledgements. The author acknowledges with pleasure the cooperation of Dr. H. Moser in some of the early experiments, and the help of Miss W. Wheeler and Mrs. M. Smith in carrying out the tests for heterogeneity.

Dr. C. Auerbach, Institute of Animal Genetics, West Mains Road, Edinburgh 9.

Zeitschrift für indukt. Abstammungs- und Vererbungslehre, Bd. 87, S. 648—667 (1956)

Institute of Animal Genetics, Edinburgh

STUDIES IN QUANTITATIVE INHERITANCE

IX. THE EFFECTS OF INBREEDING AT DIFFERENT RATES IN *DROSOPHILA MELANOGASTER*

By

A. O. Tantawy* and E. C. R. Reeve**

With 6 figures in the text

(Eingegangen am 18. Juni 1956)

Table of Contents

page

1. Introduction 648
2. Plan of experiment 650
3. Calculation of inbreeding coefficients 651
4. Changes in character means and variances 652
   a) Survival from egg to imago p. 652. — b) Net fertility p. 653. — c) Mean and phenotypic variance of body-size p. 654.
5. Changes in the genetic variance of wing length 657
6. Discussion and Conclusions 661

Summary 664

Appendix: Inbreeding coefficients for progeny tests 665

References 667

1. Introduction

Much is known about the theory of inbreeding, for a locus not under selection, from the work of Wright (1921), Haldane (1937) and Fisher (1949). More recently, Hayman and Mather (1953) have shown that selection against homozygosis, acting equally within and between inbreeding lines, can prevent fixation at a locus for which both homozygotes have a selective disadvantage of as little as 25% for sib-mating and 15% for double-first cousin mating. Reeve (1955) has examined the effects of selection against homozygosis, acting within lines only, on various inbreeding systems, and Haldane (1956) and Reeve (1956a) have made further contributions to the problem of selection during selfing. A. Robertson (1952) has shown that the genetic variance within inbreeding lines may be increased during the early stages of inbreeding by the presence of recessive alleles at low frequency.

To set against this theoretical picture, we have very little experimental data upon the rate of fixation of particular loci, or upon the rate of elimination of genetic variance, with different inbreeding systems. Bateman and Mather (1951) found that the genetic variance of ear internode length in barley declined more rapidly than expected, during selfing from the F_2 of a cross between two strains, suggesting either linkage of + and − genes in coupling, or selection in favour of homozygotes. Since barley is a natural inbreeder, we cannot take this result as typical of an outbreeding species.

* Faculty of Agriculture, University of Alexandria, Egypt.

** Member of Agricultural Research Council Scientific Staff, Institute of Animal Genetics, Edinburgh.

Kerr and Wright (1954) and Wright and Kerr (1954) measured the rate of fixation of the sex-linked genes *forked* (*f*) and *Bar* (*B*) and their + alleles, in populations of four males and four females of *Drosophila melanogaster*. Fixation at both loci was more rapid than could be expected if all eight parents were contributing to successive generations, and although mild selection against *ff* and strong selection against *BB* occurred, there was no evidence of selection against homozygosity of the + allele at either locus. It may be inferred that there was little or no selection against homozygosity at loci closely linked to the *f* and *B* loci, since this would tend to slow down their rate of fixation. If selection against homozygosity occurs in *D. melanogaster*, it should be milder for sex-linked than for autosomal loci, since the former are exposed in single dose in males, so that the more deleterious recessives would be eliminated. This conclusion is supported by experimental evidence that homozygosity of the X chromosome causes much less depression in various quantitative characters than homozygosity of either of the large autosomes (Robertson and Reeve 1955b). So it is possible that small-population experiments of the kind carried out by Kerr and Wright would demonstrate a selective advantage of the heterozygote at many autosomal loci.

Gowen et al. (1946) found that long-inbred lines of *D. melanogaster* were frequently not homozygous, since lethals might be present on chromosomes II or III, while egg-production was reduced below the inbred level by a process of extracting supposedly homozygous genotypes from the inbred lines. It is not clear, however, whether the residual heterozygosity in these lines was due to a general tendency for selection to favour heterozygotes, or to the occurrence of balanced lethal systems which maintained additional heterozygosity by linkage.

Shultz and Briles (1953) found evidence of selection favouring heterozygosity of blood-group genes in chickens, during mild inbreeding, but this case is complicated by the fact that the various lines were artificially selected for different characters while being inbred.

Little other direct work on the effectiveness of inbreeding in eliminating heterozygosity seems to have been undertaken. But it is the general experience of breeders that inbreeding of a normally outbred species leads to a depression of many characters associated with vigour and fertility, and this clearly implies that appreciable selection favouring heterozygosity occurs during inbreeding. Either the heterozygote at certain loci has a selective advantage over both alternative homozygotes, or there are a number of linked loci at which at least one allele, when homozygous, reduces fitness.

One interesting consequence of selection against homozygosity is that it will reduce the rate of fixation at a locus by any inbreeding system, but the reduction will not be proportionate to the normal speed of fixation for inbreeding systems of different intensity. This is illustrated in Table 1, based on the computations of Reeve (1955) for within-line selection against homozygosity.

Column (a) gives the number of generations required to halve the frequency of heterozygotes at a locus, when there is no selection against homozygosity, for four standard inbreeding systems. Column (b) gives the number of generations required to make the same inbreeding progress when 75% of all individuals

homozygous for the locus die before they can be mated, and (c) gives the ratios (b)/(a). It is assumed that once a line has become homozygous it is not lost because of lowered fertility.

In the absence of selection, selfing halves the heterozygosity in 1 generation, full-sib mating in about $3^1/_4$ generations and D.F.C. (double first cousin) mating in about $8^1/_4$ generations. But with 25% survial of homozygotes selfing is slowed down about 3 times, full-sib mating 8 times, half-sib mating 17 times and D.F.C. mating over 60 times, as shown by the ratios in column (c). Evidently direct selection in favour of heterozygosity causes a disproportionate reduction in the speed of fixation with the milder inbreeding systems, and it seems likely that the same type of result would be found where selection against homozygosis acts on one allele at each of a number of linked loci, though this has not yet been proved.

Table 1. *Effect of selection against homozygotes on rate of inbreeding*

Inbreeding system	No. of generations required to halve heterozygosity		
	Survival of homozygotes		Ratio (b)/(a)
	100 % (a)	25 % (b)	(c)
Selfing	1.00	3.11	3.11
Full-sib mating	3.27	26.10	7.98
Half-sib mating[1]	4.97	84.3	16.9
Double first cousin mating .	8.27	509.8	61.6

[1] A male mated to two of his half-sisters who are full sisters to each other.

For these reasons it seemed of interest to inbreed a number of lines of *D. melanogaster* at different rates, and to compare changes in the mean and variance of a typical quantitative character, such as body-size, when the various lines had reached theoretically the same level of inbreeding. If selection against homozygosity occurs during inbreeding, then the more rapidly inbred lines should show greater changes than the slowly inbred lines, when tested at the same level; and the differences due to rate of inbreeding should give some indication of the magnitude of the selection going on. This experiment will be described in the following pages.

2. Plan of Experiment

All lines were started simultaneously from the Nettlebed wild stock of *D. melanogaster*, after it had been maintained in mass laboratory culture for about 3 years, and the experiment was carried out at 25° C, using the culture methods described by Robertson and Reeve (1952).

Five replicate lines were maintained of each of the following systems of inbreeding:

Inbreeding system	No. of parents per line	No. of matings per line
(a) Full-sib mating	2	1
(b) Half-sib mating	3	2
(c) Double first cousin (D.F.C.) mating . . .	4	2
(d) Cyclic between 3 pairs	6	3

In (b), a male from one mating is crossed with two females from the other mating, to give the two matings of the next generation, which are kept separate,

so that the male is always mated to two of his half-sisters who are full sisters to each other. (c) is the usual system with two pair-matings, A and B, say: A ♂×B ♀, and B ♂×A ♀ give A and B of the next generation. (d) is a similar system of intercrossing among 3 pair-matings, A, B and C, so that A ♂×B ♀, B ♂×C ♀ and C ♂×A ♀ give A, B and C of the next generation.

Progeny tests were made when the various lines had reached inbreeding coefficients of about 25, 50, 67 and 75—80%, and provided estimates of survival from egg to adult, and of the mean, genetic variance and phenotypic variance of body-size. Wing-length, as measured by Robertson and Reeve (1952), was taken as the measure of body-size. The 3-pair cyclic lines were only carried to about 60% inbreeding, because of their slow rate of progress. "Net fertility" was measured every generation. This was the total number of flies emerging from three cultures in which a newly mated pair had been left to lay, successively, for 4 days, 3 days and 3 days. 20 matings were tested each generation from each inbreeding system.

For the progeny tests, a number of pair matings were made and the parents and samples of their progeny cultured on two successive days were measured. The structure of these tests was rather complex, and may be illustrated by the test on half-sibs at gen. 12, when they were 81.3% inbred. We have the following steps:

Gen. 10: each line consists of one male mated to two females, to form matings A and B.

Gen. 11: the line is continued and 4 additional A males are each mated to 2 B females, to give 4 families of 2 matings each.

Gen. 12: within each of these families 5 males of one mating and 5 females of the other are measured, and 4 of them pair-mated assortatively (largest × largest, etc.), after a middle-sized male and female have been discarded. These pairs are the parents in the progeny test.

The eggs laid by each pair are cultured for 3 days, and 5 female progeny are measured from each of the first two days' cultures, and compared with non-inbred Nettlebed controls reared concurrently. Thus we have 10 female progeny per mating, 4 matings per family, 4 families per line, and 5 lines per inbreeding system, in the complete test.

Tests on the other inbreeding systems were similar except for the relationship between mates of the parent generation, which was that characteristic of the system tested. Also tests had sometimes to be limited to 3, or even 2 families per line, when two tests overlapped; and parent matings sometimes failed, or produced less than 10 female progeny.

All cultures contained eggs laid over a 24-hour period, and were limited to 70 eggs per vial.

Some additional data were collected by intercrossing the lines of the sib and half-sib mating systems, respectively, after their last progeny tests. A similar experiment with the D.F.C. lines was discarded because some of them appeared to have become contaminated.

3. Calculation of inbreeding coefficients

The expected level of inbreeding at any stage may be expressed by Wright's (1921) coefficient of inbreeding F, defined as $H = 2pq(1-F)$, where H is the

fraction of the population still heterozygous at a given locus. F varies from zero with panmixia to unity with complete homozygosity, and measures the fraction of the original heterozygosity which has been lost, so that $100\,F$ gives the expected percentage loss of heterozygosity.

The recurrence relations for H are as follows (Table 2):

Table 2. *Recurrence relations and dominant roots*

Mating system	Recurrence relation	Dominant root of generation matrix
(a) Sib mating . . .	$H_n = \frac{1}{2}H_{n-1} + \frac{1}{4}H_{n-2}$	0.80902
(b) $\frac{1}{2}$-sib mating . . .	$H_n = \frac{1}{2}H_{n-1} + \frac{1}{4}H_{n-2} + \frac{1}{16}H_{n-3}$	0.86995
(c) D.F.C.-mating . .	$H_n = \frac{1}{2}H_{n-1} + \frac{1}{4}H_{n-2} + \frac{1}{8}H_{n-3}$	0.91964
(d) Cyclic 3 pairs . .	$H_n = \frac{3}{4}H_{n-1} + \frac{1}{8}H_{n-2} + \frac{1}{16}H_{n-3}$	0.95064

Formulae (a), (b) and (c) are given by Wright (1921) (see also Li 1955), and (d) is easily derived by the same methods. Table 3 gives the values of $100\,F$ for successive generations of each inbreeding system, and primes (1) indicate the generations of the parents of each progeny test. The test intercrosses were made one generation after the prime indicating the last progeny test.

Table 3. *Percentage coefficients of inbreeding with different mating systems.*

Generation	Sibs	$\frac{1}{2}$-sibs	D.F.C.	Cyclic 3 pairs
0	0.0	0.0	0.0	0.0
1	25.0[1]	12.5	0.0	0.0
2	37.5	25.0[1]	12.5	6.2
3	50.0[1]	34.4	18.7	10.9
4	59.4	43.0	25.0[1]	15.2
5	67.2[1]	50.4[1]	31.3	19.4
6	73.4	56.8	36.7	24.4[1]
7	78.5[1]	62.4	41.8	27.2
8	82.6	67.3[1]	46.5[1]	30.8
9	85.9	71.6	50.8	34.2
10	88.6	75.3[1]	54.7	37.5[1]
11	90.8	78.5	58.4	40.5
12	92.6	81.3[1]	61.7	43.5
13	94.0	83.7	64.8[1]	46.3
14	95.1	85.8	67.6	49.9[1]
15	96.1	87.7	70.2	51.4
16	96.8	89.3	72.6[1]	53.8
17	97.4	90.7	74.8	56.1
18	97.9	91.9	76.8[1]	58.3
19	98.3	92.9	78.7	60.3

[1] Parent generations in progeny tests.

Additional inbreeding coefficients will be needed when we come to compare genetic and phenotypic variances, since these will be based on groups of progeny which are full sibs in addition to having parents whose relationship is characteristic of the inbreeding system in question. The methods of calculating these coefficients will be described in an appendix.

4. Changes in character means and variances

a) Survival from egg to imago. Fig. 1 shows the number of flies emerging per 100 eggs cultured, based on cultures of the eggs laid by a single female during 24 hours, with a maximum of 70. The control level is 71%, based on a test at the start of inbreeding, and agrees well with other estimates made under similar conditions. Some of the fluctuations in the trends can be attributed to variations in age of parent females, which it was not practicable to standardise. The inbreeding coefficients are those of the progeny in the progeny tests.

The average trend is rather irregular, but it appears that survival first starts to decline after about 50% inbreeding, and declines most rapidly at the highest inbreeding levels tested. There is perhaps a suggestion that in the final tests the most rapid inbreeding system has been most effective in reducing survival, but the evidence on this point is far from being conclusive.

b) Net fertility. The total output of a pair left for 4 days, 3 days and 3 days, respectively, in 3 successive vials of medium, was estimated every generation up to the 18th for each inbreeding system. Nettlebed controls, run concurrently, produced an average output per pair of 33.3 adults per day but in different generations their mean ranged from 25.5 to 41.3 adults daily. The controls and inbred lines showed correlated fluctuations and fig. 2 gives the percent deviation from controls every generation for each inbreeding system. Marked fluctuations still occur, but the general effects of inbreeding in reducing fertility are perfectly clear, and rapid inbreeding produces the most rapid decline, as might be expected.

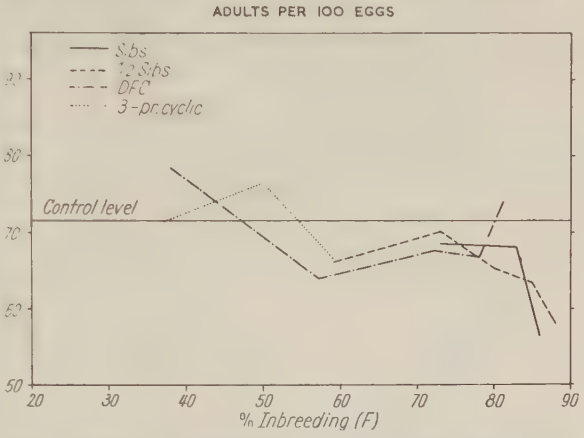


Fig. 1. Effects of inbreeding on rate of survival from egg to imago, with different inbreeding systems

It is difficult to compare the lines on the basis of level of inbreeding instead of generation number, in view of these fluctuations, but a rough comparison is given in table 4. Both fertility of the parents and survival of the progeny contribute to this measure of net fertility, so that the most appropriate inbreeding coefficient for any generation might be intermediate between the two generations. In table 4 we have taken the parental coefficient for each generation.

Table 4. *Effect of inbreeding on net fertility*

	Inbreeding system			
	sib	½-sib	D.F.C.	3 pairs
(1) % inbreeding at gen. 16	96.8	89.3	72.6	53.8
(2) % fertility lost gens. 14–18	19.3	17.9	12.5	8.2
(3) Expected loss at 100% inbreeding .	20.2	20.0	17.2	15.2
(4) Calculated loss at 72.5% inbreeding	12.7	14.9	12.5	—

Row (1) shows the coefficient of inbreeding, at gen. 16, in each system; and (2) gives the % loss of fertility to this point, estimated as the average loss at generations 14–18 inclusive. The loss evidently becomes steadily greater as the inbreeding level goes up. Dividing (2) by (1), as in row (3), gives the expected loss at 100% inbreeding, assuming a linear rate of change, and shows a higher loss (20%) in the more rapidly inbred systems than in the less rapidly inbred

(17 and 15%). This difference might be due either to the greater effectiveness of more rapid inbreeding, or to an increasing rate of loss at the higher levels of inbreeding.

Row (4) is intended to test the two hypotheses. It gives the loss of fertility to about 72.5% inbreeding, based on the averages of generations 4–8 in sibs, 7–11 in $^1{}_2$-sibs and 14–18 in D.F.C. mating, all of which average about the same inbreeding level. The figures 12.7, 14.9 and 12.5% for sib, $^1/_2$-sib and D.F.C.

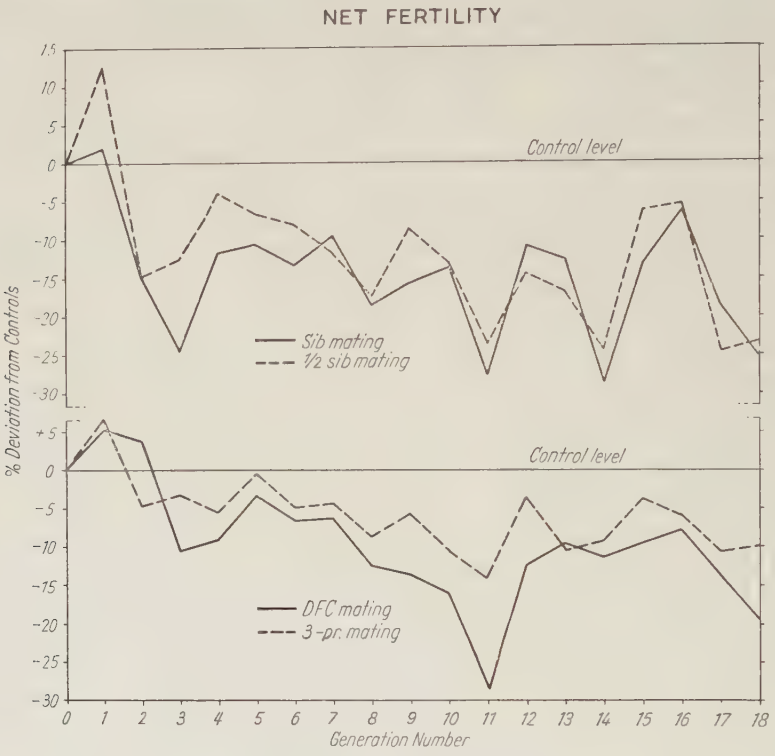


Fig. 2. Effects of inbreeding on net fertility (total progeny produced by a pair laying for 10 days) with different inbreeding systems

mating suggest that the rate of inbreeding has little influence on the loss at a given inbreeding level, since there is now no trend in loss of fertility against intensity of inbreeding. We must therefore attribute the differences in row (3) of table 4 to a tendency for fertility to decline at an increasing rate as inbreeding progresses, rather than to any greater effectiveness of the more rapid inbreeding systems. Fertility thus appears to show the same tendency as survival from egg to adult in this respect. One would, of course, expect to find correlated variation in the two indices, since rate of survival must affect net fertility.

c) Mean and Phenotypic variance of body-size. Changes in mean wing-length, expressed as percentage deviation from controls, are shown for each inbreeding system in fig. 3, and the mean trend for all systems is plotted in the inset graph of fig. 3. The fluctuations from test to test cannot all be attributed to genetic drift, since inbreeding lengthens development appreciably, and makes

a wild stock rather a poor control for an inbred line — presumably because critical stages of development are no longer exactly contemporary in control and inbred line.

Rapid inbreeding does not appear to have been more effective than slow inbreeding in reducing size, since the sib-mated lines are no smaller than the others. The average trend in fig. 3 is based on the assumption that the rate of inbreeding does not affect the loss to a given inbreeding level, and gives the averages over all inbreeding systems of tests at different inbreeding levels. These averages, together with corresponding averages for thorax length, which was measured at the same time as wing length, are given in table 5. Unweighted averages both of F and of the two dimensions are used. Long inbred lines appear to average some 5% decline in wing length and 2.5% decline in thorax length (ROBERTSON and REEVE 1955b). These values for 100% inbreeding are shown in table 5, and by the broken line in fig. 3 inset.

Table 5. *Changes in mean wing and thorax length during inbreeding.*
Averages for all mating systems

Inbreeding level		No. of tests	Percent. decline in mean:	
Range	Average		Wing length	Thorax length
27–38%	32	4	+0.11	+0.12
51–59%	55	4	−0.49	−0.22
68–70%	72	4	−0.54	−0.19
78–86%	82	6	−1.09	−1.07
—	100	—	−5	−2.5

The average trend suggests that body size hardly declines before F reaches 50%, and is then reduced slowly by further inbreeding up to about $F = 80\%$. Beyond this point the decline becomes much more rapid, and most of the reduction in size found in long inbred lines probably occurs, as a rule, when

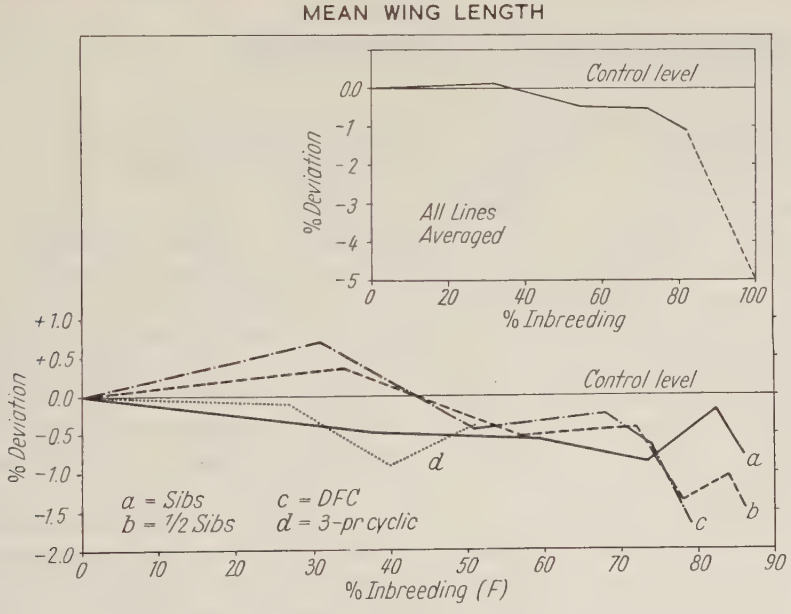


Fig. 3. Effects of inbreeding on mean wing length with different inbreeding systems. Inset graph shows the average trend when all lines are combined

the inbreeding coefficient has already reached a high level, say over 80%. Thus mean size and ability to survive both show the same curvilinear trend when plotted against inbreeding coefficient. Wing and thorax length behaved in much the same way, and further analysis of body size is confined to wing length.

Changes in phenotypic variance of wing length, measured as squared coefficient of variation (which eliminates sex differences in variance), are shown in fig. 4. These are the within-culture (i.e. among full sibs) variances of the progeny in each test, and they are plotted against the equivalent inbreeding coefficient

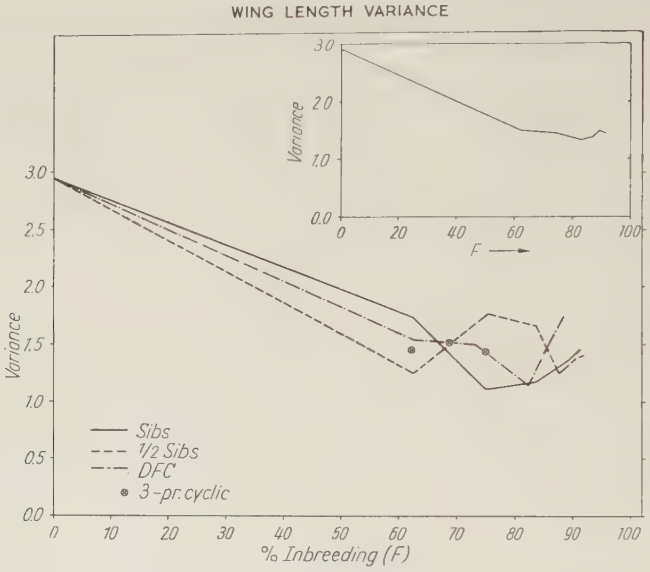


Fig. 4. Effects of inbreeding on phenotypic variance (squared coefficient of variation) of wing length, with different inbreeding systems. Inset graph shows average trend when all lines are combined

$(1+F)/2$, where F is the coefficient of the parent generation in the test, since their genetic variance would be $\left(1-\frac{1+F}{2}\right)$ of the initial variance, if all genetic variance were additive (see appendix).

Fig. 4 shows both the individual estimates for each inbreeding system, and (inset) the average variance at different F values obtained by grouping tests with similar F's. Unfortunately, we have no estimates for F less than 60%, but about half the phenotypic variance has been lost by this point, and there is very little decline with further inbreeding. Thus, in contrast to the behaviour of the mean, the phenotypic variance appears to fall most rapidly in the early generations of inbreeding. Doubtless the explanation lies in the fact that inbreeding causes a rise in the environmental variance at the same time as the genetic variance declines (Robertson and Reeve 1955b). The curvilinear trend of the inset graph suggests that the environmental variance rises most rapidly in the later generations of inbreeding; and there is supporting evidence for this in the fact that, when a particular chromosome is made homozygous, the increase in the environmental variance is greatest when the other chromosomes are homozygous (Robertson and Reeve 1955b).

5. Changes in the genetic variance of wing length

Since the environmental variance rises at an unknown rate during inbreeding, we cannot subtract it from the phenotypic variance in order to estimate the genetic variance. So estimates of the latter must be based on correlations between parent and offspring or between sibs, which include the "additive" genetic variance, and half the dominance variance for sibs. In addition, the epistatic variance contributes something to all estimates (FISHER 1918, COCKERHAM 1954) and its contribution even to the parent-offspring correlation may be considerable in certain genetic situations (WRIGHT 1952, table 8).

Evidently these estimates cannot be given a precise theoretical meaning, and we shall consider only the two simplest possible indices of genetic variance:

(1) heritability (h^2) measured as the regression of progeny on the midparent phenotype,

(2) heritability estimated from the correlation between full-sibs.

Of these, the first should not be appreciably biassed by the assortative mating used in the progeny tests, but (2) will be increased by assortative mating, apart from its effects on any non-additive genetic variance (REEVE 1953, 1956b).

Table 6. *Heritability of wing length in Nettlebed stock*

Progeny Test	Mating System	No. of matings	Heritability %
1 (Dec. 1948)	Assortative	15	32 ± 6.0
2 (Dec. 1949)	Random	40	23 ± 12.0
3 (Nov. 1950)	Assortative	37	21 ± 4.0
Weighted average			24.3 ± 3.2
Selection Experiments			
1 May—July 1950			37.6
2 Jan.—March 1951			44.3
Average			41.0
Overall average			32.7

Heritability from regression of progeny on mid-parent. The estimates available of the heritability in the wild stock are given in table 6. They include the regression of progeny on mid-parent phenotype in three progeny tests, and estimates based on the total divergence of the lines selected during four generations for long and short wings, as a fraction of the cumulative selection differential, in two selection experiments. The date of each test is given. The inbreeding experiments started early in 1950.

The standard errors of the progeny test regressions probably underestimate the possibilities of variation between tests, but are used to calculate a weighted average. The two selection experiments gave much the higher values of h^2 than the progeny tests (average 41 compared with 24%), and make the proper estimate for the base population somewhat uncertain. The best we can do seems to be to take an unweighted average of the means of the two types of estimate, giving 32.7%. This figure agrees well with estimates on other stocks, but must be taken as somewhat tentative.

Table 7 gives the estimates of h^2 obtained from the regression of progeny on mid-parent wing length in each progeny test, together with the standard error of each estimate. The appropriate inbreeding coefficient is that of families of full sibs of the parent generation in the test, and is shown alongside each estimate (see formula for φ_1 in appendix).

Table 7. h^2 *from regressions on mid-parent wing length*

Sib mating		½-sib mating		D.F.C. mating		3 pair cyclic mating	
F %	h^2 %	F %	h^2 %	F %	h^2 %	F %	h^2 %
50	33.4 ± 4.2	56	22.2 ± 3.4	59	24.0 ± 4.3	60	27.4 ± 5.3
69	20.8 ± 6.7	71	26.0 ± 6.4	71	13.7 ± 5.9	67	16.1 ± 6.2
80	7.9 ± 9.2	81	20.7 ± 5.1	81	12.1 ± 9.5	73	20.2 ± 5.2
87	13.7 ± 4.7	86	9.2 ± 8.0	85	18.6 ± 7.4		
		89	15.6 ± 6.7	87	17.7 ± 4.4		

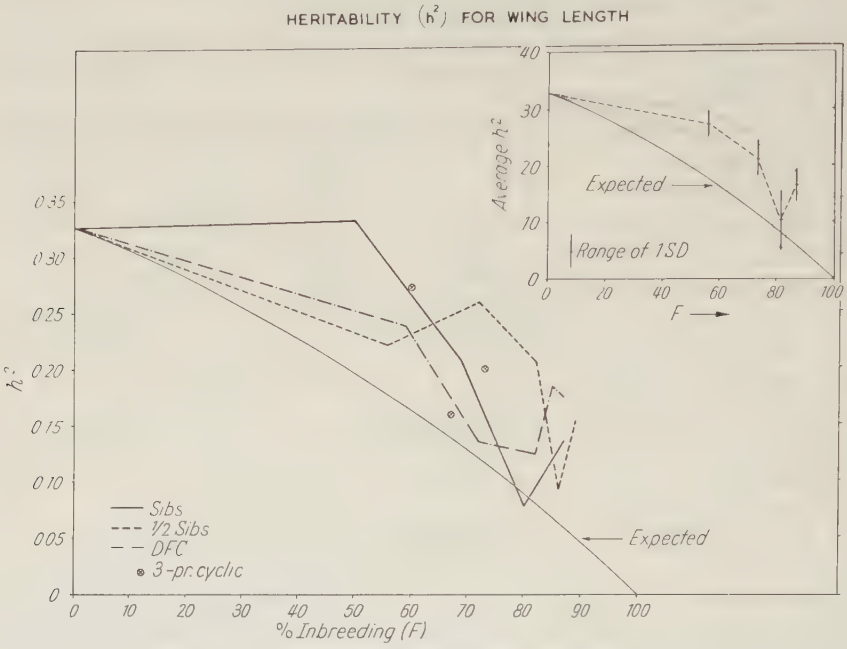


Fig. 5. Effects of inbreeding on heritability of wing length (regression of progeny on mid-parent phenotype, within lines), with different inbreeding systems. Inset graph shows weighted average of all lines (———) and deviations one standard deviation on each side of the average (- - - -)

In fig. 5, h^2 is plotted against inbreeding coefficient, F, for each system, and compared with the expected trend given by Wright's (1921) equation $h^2 = \frac{(1-F)h_0^2}{1-Fh_0^2}$ where h_0^2, the initial heritability, is taken as 0.327.

This formula only holds for constant environmental variance and purely additive genetic effects. It will be too high at the higher F values because the environmental variance is known to increase as inbreeding progresses; but it is not possible to predict what the effects of non-additive genetic variance would be. Thus, in a genetic system consisting of recessive genes at low frequency, the variance within lines would actually rise during inbreeding up to about $F = 50\%$ (A. Robertson 1952), and it is easy to show that a system of recessives at high frequency would cause the loss of variance to be most rapid during this same period. The ready response to selection in both directions, and evidence from other tests (Robertson 1956) shows that the genetic situation is neither so extreme nor so simple as this, but involves a good deal of interaction between

non-allelic genes, which tends to become of increasing importance as the genetic background becomes more homozygous. We shall take up this point again later.

It is obvious, from fig. 5, that h^2 declines much more slowly than the theoretical curve with all inbreeding systems. This is brought out more clearly in fig. 5 (inset), where the average h^2 for different inbreeding levels is plotted, and a range of one standard deviation on each side of the average line is shown by dotted lines. The tests at $F = 80$–81% were small scale tests and give an average with a large standard error. This is the only point in the inset graph which does not lie significantly above the theoretical line (see table 8), and, discounting this point, we see that the ratio of mean observed h^2 to the expected value increases as inbreeding progresses, the ratio at $F = 87\%$ being about 2.6:1.

Table 8. *Average h^2 for wing length at different levels of F*

Inbreeding level (F)		No. of tests	Average h^2 %	Expected h^2 %	Ratio observed / expected
Range	Average				
50–60%	56	4	26.2 ± 2.1	18.0	1.45
69–73%	73	4	20.2 ± 3.0	11.5	1.74
80–81%	81	3	9.5 ± 5.1	8.5	1.12
87–89%	87	3	15.7 ± 2.9	6.0	2.62

Looking at it in another way, by comparing the F values with the same h^2 for the theoretical and average lines of fig. 5 (inset), we might say that actual inbreeding to $F = 50\%$ ($h^2 = 29\%$) represents effective inbreeding to only $F = 20\%$ ($h^2 = 29\%$ on theoretical curve), while 70% inbreeding is equivalent to only about 40%, 90% to a little over 60% effective inbreeding. It is difficult to believe that these differences between observation and simple theory could be due entirely to non-additive genetic effects, and selection against homozygosity must be an important contributing factor.

Table 9. *Average h^2 for each inbreeding system, with F 80–89%*

Inbreeding system	No. of tests	Weighted averages	
		F %	h^2 %
Sib mating . .	2	85.5	12.5 ± 4.2
½-sib mating . .	3	84.3	16.8 ± 3.6
D.F.C. mating .	3	85.7	17.1 ± 3.5

If selection against homozygosity occurs, we should expect it to be more effective in delaying inbreeding progress in the more slowly inbred lines (Reeve 1955), so that h^2 should have dropped most, at a given F value, in the sib-mating lines. Table 9 gives the average h^2 and F for all tests made on each system with F 80% or more. As in the previous table, weighted averages are used, the weights being the reciprocals of the squared standard errors.

The differences between systems in h^2 are not statistically significant, but they are in the expected order, sib-mating having the lowest and D.F.C. mating the highest h^2. This offers some support to the hypothesis that the slow rate of decline in h^2 is at least partly due to selection acting against homozygosity.

Heritability from correlation between sibs. These estimates are based on the components of progeny variance within and between matings in the progeny tests. As shown in the appendix, these components have the following expectations, on the assumption that all genetic variance is additive, and the environmental variance is constant:

Table 10. *Expectation of components of progeny variance*

Component of Variance	Expectation
(W) Within cultures = between full sibs	$\frac{1-F}{2}G+E$
(B) Between matings	$\frac{1-F'}{4}G$
(T) Total	$\frac{3-2F-F'}{4}G+E$

Here G and E are the genetic and environmental variances in the non-inbred population, F is the inbreeding coefficient of the parent generation in the progeny test (marked with prime in table 2), and F' that of the preceding generation in the inbred line being tested.

h^2 is measured as the fraction of the variance in T which is genetic, and is estimated as $h^2 = KB/T$

$$\text{where } K = \frac{3-2F-F'}{1-F'} = 1 + \frac{2(1-F)}{1-F'}.$$

As inbreeding progresses, the ratio $(1-F)/(1-F')$ becomes closer and closer to λ, the dominant latent root of the generation matrix for the inbreeding system in question. So we have $K = 1+2\lambda$ for later inbreeding generations in all systems. The values of λ for the different systems are given in table 2.

From table 10, we see that the expected fraction of the initial genetic variance lost in T is $\varphi = \left(1 - \frac{3-2F-F'}{4}\right) = \frac{1+2F+F'}{4}$. So this is the appropriate inbreeding coefficient for the estimate of h^2 provided by KB/T.

The tests of most interest are those made at the highest levels of inbreeding, and the data from the last two tests on each inbreeding system are summarised in table 11.

Table 11. *Genetic variance of wing length within inbred lines* (1/100 mm)²

Inbreeding System	Sibs	½-sibs	D.F.C.	Sibs	½-sibs	D.F.C.
Parent generation	5	10	16	7	12	18
Inbreeding level (φ) . . .	73.5%	80.5%	78.9%	82.6%	85.3%	82.1%
			(1) *Degrees of Freedom*			
(a) Within cultures . . .	226	217	403	404	512	553
(b) Between cultures . . .	20	18	37	35	44	50
(c) Between matings . . .	21	21	37	39	47	51
			(2) *Mean Squares*			
(a) Within cultures . . .	6.06	5.59	7.12	6.26	6.40	7.61
(b) Between cultures . . .	7.53	6.90	9.82	6.78	10.38	4.99
(c) Between matings . . .	9.36	8.45	16.90	7.26	12.82	12.82
			(3) *Components of variance per fly*			
(W) Within cultures . . .	6.06	5.59	7.12	6.26	6.40	7.61
(B) Between matings . .	0.187	0.165	0.716	0.052	0.252	0.527
(T) Total	6.247	5.755	7.836	6.321	6.652	8.137
$K=1+2(1-F)/(1-F')$.	2.616	2.740	2.839	2.617	2.740	2.841
$h^2\ \% = 100K(B)/(T)$ . .	7.8	7.9	25.9	2.2	10.4	18.4

The upper half of the table needs little explanation. The mean square "between cultures" is the interaction of days × cultures, and is usually greater than the variance within cultures, showing that conditions vary somewhat from tube to tube and on different days. The component of variance "between matings" is calculated as Mean Square (c)—Mean Square (b) [or (a) if (a) is greater than (b)] divided by the average number of flies measured per mating. The "between culture" component is omitted, since we are interested in the heritability within cultures. K and h^2 are calculated as explained above. Standard errors cannot be fitted to the estimates of h^2, but the three estimates on the right are based on larger numbers and so are more reliable than those on the left.

Table 12.
h^2 for wing length in first progeny tests

Inbreeding system Mating of:	Regression estimate		Correlation estimate	
	F	h^2%	F	h^2%
Full sibs . .	50	33.4	38	31.9
Half sibs . .	56	22.2	41	16.8
D.F.C.s . .	59	24.0	42	28.9
3 pairs . . .	60	27.4	42	36.5
Averages . .	56	26.8	40.5	28.5

Allowing for the variations in inbreeding level, shown at the head of the table, there is clearly the same trend as before, in that h^2 is highest with D.F.C. mating and lowest with sib-mating, this being so in both series of tests. Although the regression and sib-correlation estimates are obviously correlated, this gives some additional confirmation that the trend is a real one.

Finally, it is of interest to compare the two types of estimate in the early generations of inbreeding, since this should give a rough indication of the importance of dominance effects.

Table 12 gives a comparison of the estimates based on regression and sib-correlation in the first test made on each inbreeding system.

Judging by fig. 5, the average regression h^2 at $F = 40\%$ should be 29%, which agrees very closely with the sib-correlation average of 28.5% in table 12 (the latter will have been a little inflated by the assortative mating in the tests). Evidently, the correlation between sibs is no larger, on the average, than that between parent and offspring, and this suggests that dominance deviations do not contribute very much to the genetic variance, in the early generations of inbreeding, though any interpretation of the meaning of these correlations must be somewhat tentative in view of the work of COCKERHAM (1954) and KEMPTHORNE (1954, 1955).

6. Discussion and Conclusions

On the simplest assumptions, the inbreeding coefficient F measures the fraction of the originally segregating loci which have been made homozygous by inbreeding, so that mean size and genetic variance should, on the average, decrease in proportion to F. Actually, we have found that mean size and survival have hardly declined at all up to $F = 50\%$, when half the loci should have been fixed, and the genetic variance has also dropped very little by this stage. With further inbreeding the mean begins to drop slowly, but with increasing rapidity, so that most of the total decline in mean size probably takes place after F reaches, say, 80%.

This non-linear decline in mean and genetic variance is almost certainly due to two different effects. First, we have the influence of natural selection, which will slow down the rate of fixation at particular loci because of the reduced fitness of individuals homozygous at these loci. If the differences in fitness are at all large, we may expect a considerable reduction in the rate of fixation both at these loci and at loci closely linked to them (Reeve 1956a).

Secondly, there is evidence from work on the effects of making particular chromosome pairs heterozygous and homozygous in genetic backgrounds of varying heterozygosity, that a given increase in homozygosity causes a much greater decline in mean size and mean egg production, on the average, when the genetic background is homozygous than when it is heterozygous (Robertson and Reeve 1955b). This would lead us to expect that, during the early stages of inbreeding, when plenty of genetic variability remains unfixed, a number of loci can be fixed without causing much depression of mean size, etc., but as the genetic background becomes more homozygous, the genotype becomes progressively more sensitive to further fixation.

Such a law of increasing sensitivity to fixation would lead to just the kind of trend in mean size and survival which we actually found. It would also mean that the segregation effects of individual unfixed loci on size would tend to increase as the genetic background becomes more homozygous, so that the genetic variance per unfixed locus would become greater as inbreeding progresses, and the total genetic variance would decline more slowly than the expected rate. This would explain at least part of the trend in h^2 plotted against F, shown in fig. 5.

Selection acting against homozygosity at particular loci will slow down the rate of fixation, both of the loci directly affected and of loci linked to them, and such selection will also have a relatively greater effect with slowly inbred than with rapidly inbred lines. It is probable that genes which, when homozygous, reduce fitness most, would also tend on the average to reduce body-size more than those with only slight effects on fitness; and if this is the case the genes causing the greatest reduction in size would tend to be fixed least rapidly, so that a curvilinear trend in the relation of mean size to inbreeding coefficient of the kind shown in fig. 3, would be expected.

These two kinds of effect, the increasing sensitivity of the character means to the effects of further fixation, as the genetic background becomes more homozygous, and the effects of natural selection against homozygosity at some loci, doubtless act together to produce the rather striking discrepancies between the observed and expected trends during inbreeding revealed by our experiments. The relative contribution of each effect cannot be estimated, and we cannot, unfortunately, deduce whether selection against homozygosity is likely to be a major factor acting on numerous loci, or only of minor importance. The two effects are, in fact, not really separable, since the increased sensitivity to further fixation as inbreeding progresses means that selection against homozygosity at an unfixed locus, even if mild at first, will tend to become stronger as the genetic background becomes more homozygous. For instance, fixation at some loci may result in a gene at another locus being turned into a recessive lethal. Selection against homozygosity doubtless includes cases of "dominance" (selection

against the recessive homozygote only) and "overdominance" (selection against both homozygotes), and the changing pattern of interactions as inbreeding proceeds may often change one type into the other. The validity of the distinction between the "dominance" and "overdominance" theories of heterosis, is, for this reason, questionable: both treat intra-locus effects in isolation from each other, and ignore the important fact that the level of dominance or overdominance at a particular locus depends largely on the genetic background, and is probably particularly influenced by the proportion of other loci which are homozygous.

Body-size in *D. melanogaster* is a character which does not show a great deal of inbreeding depression, and moderate variations in size appear to have little effect on fitness. Nevertheless, appreciable discrepancies become apparent between the observed trends in its mean and variance during inbreeding and those expected on simple theory. Probably other characters of more direct adaptive significance, and in particular many characters of economic importance in livestock, would show even more marked discrepancies between expected and actual inbreeding trends.

Data bearing on this point appear to be limited to those of Dickerson et al. (1954), who show average trends in litter size and in litter weight and pig weight at 154 days in pigs inbred to about 50% inbreeding coefficient. The three characters decline significantly during this period, and their graphs are by no means inconsistent with an increase in the rate of decline as inbreeding progresses, although the authors see "no systematic departure from a linear decline". There are marked fluctuations from year to year, due presumably to variations in environmental conditions and the absence of control lines for eliminating them, and these make it impossible to draw any conclusions about linearity.

It is easy enough to imagine genetic situations which would lead to a law of increasing sensitivity to a change in homozygosity, as the genetic background becomes more homozygous. We have only to assume some overlapping of gene functions in the typical heterozygous genotype, so that some genes can be lost by fixation of their alleles without much overall loss in biochemical efficiency. In a more homozygous background there would be much less variety of genes available to cover up the effects of further loss, with consequently greater loss as each new locus becomes fixed. This would, of course, only be a statistical effect, sometimes obscured by the major effects which fixation of a particular gene would have, whatever the genetic background (see further discussion by Robertson 1956). Evidence only seems to have accumulated at present to indicate its occurrence in size and egg production of *D. melanogaster* (Robertson and Reeve 1955b), but it seems probable that all quantitative characters in which inbreeding depression occurs would show the same effect, so that the results found for inbreeding *D. melanogaster* are probably very general effects of inbreeding. We must expect the character means to decline at an increasing rate as inbreeding progresses, and their genetic variances to decrease more slowly than would be expected on simple theory.

The authors wish to thank Dr. Forbes W. Robertson for the benefit both of critical discussion and of advice on technical problems.

Summary

1. A number of lines of *Drosophila melanogaster*, taken from a wild stock, were inbred at different rates, using sib-mating, half-sib mating, double-first-cousin mating, and cyclic mating between three pairs.

2. Survival from egg to imago, net fertility, and the mean and phenotypic and genetic variances of wing length were compared at intervals when the different lines had all reached about the same theoretical inbreeding coefficient.

3. Survival, net fertility and mean size (wing-length) decline little up to 40–50% inbreeding coefficient, and then decline with increasing speed as inbreeding progresses further. Mean size, on the average, has declined by only about 1% up to 80% inbreeding, and probably declines another 4% between 80 and 100% inbreeding.

4. The phenotypic variance of wing length declines most in the early generations of inbreeding, and shows little further reduction after about 60% inbreeding. This is attributed to the fact that, as the genetic variance decreases, the environmental variance increases, particularly during the later stages of inbreeding.

5. The heritability (h^2) of wing length, measured as the regression of progeny on mid-parent wing length in progeny tests, is taken as a rough index of the amount of genetic variance remaining within each inbred line at any stage of inbreeding.

6. On the average, h^2 declines much less rapidly than would be expected on simple theory, assuming purely additive genetic variance and a constant environmental variance. As a result, the average h^2 is about 1.4 times as high as the expected value at 50% inbreeding, and 2.6 times as high at nearly 90% inbreeding. This suggests that, judged by changes in heritability, the effective level of inbreeding at any stage is much less than the expected level.

7. The differences in h^2, between the lines inbred at different rates to the same level, are not statistically significant; but, at the highest inbreeding level tested, the most rapidly inbred lines have the lowest heritability and the least rapidly inbred lines the highest heritability of wing length. This is what we should expect if there is appreciable selection against homozygosity, which would cause a disproportionate reduction in the rate of fixation in the slowly inbred lines.

8. It is suggested that two effects contribute to the discrepancy between actual and expected trends with inbreeding and to the non-linear trends of the means. First, natural selection against homozygosity at some of the loci reduces the rate of fixation at these and linked loci. Second, the genotype becomes more sensitive to the effects of further fixation as it becomes more homozygous—i.e. when a given gene is made homozygous, the depressing effect on mean size, etc., tends to be greater in a more homozygous, than in a less homozygous genetic background.

9. Both effects probably interact so that selection against fixation at an unfixed locus will become progressively more intense as the genetic background becomes more homozygous.

10. It is suggested that these two effects will be of very general occurrence during inbreeding, for characters in which inbreeding depression occurs. The character means are likely to decline at an increasing rate as inbreeding progresses, and their genetic variances will decrease more slowly than simple theory would lead us to expect.

Appendix: Inbreeding coefficients for progeny tests

On the simplest assumptions (no selection, and purely additive genetic variance), the inbreeding coefficient (F) of an individual measures the fraction of its loci (out of those unfixed in the initial population) which has, on the average, been fixed by inbreeding. The genetic variance among a group of unrelated individuals, all with inbreeding coefficient F, obtained by inbreeding a population with initial genetic variance G, has the expected value $G(1+F)$; and within a similar group taken from a single inbred line, such that the in-

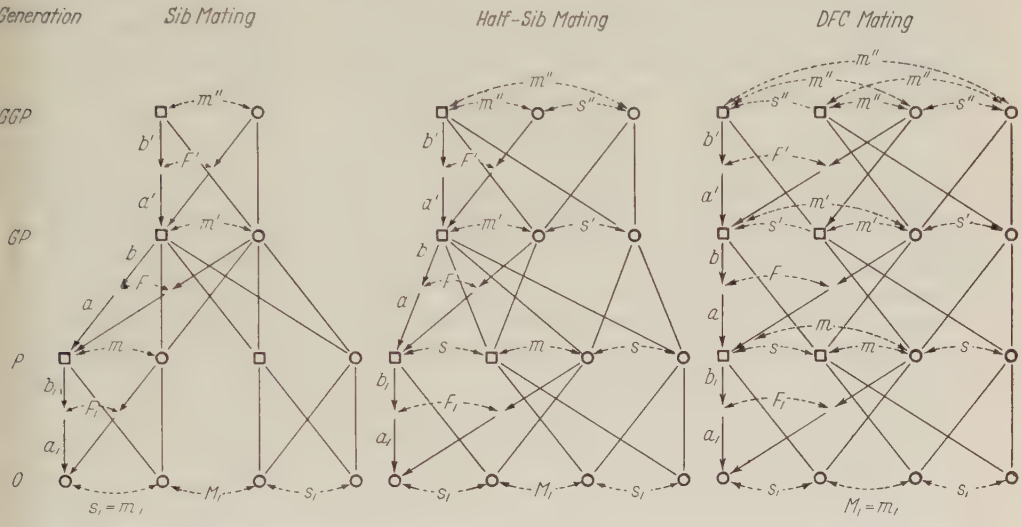


Fig. 6. Path coefficient diagrams showing structures of progeny tests on lines from different inbreeding systems. Explanation in text

traclass correlation between their genotypes is R, the genetic variance among individuals has the expected value:

$$V_{F,R} = G(1+F)(1-R).$$

R will normally be greater than F, and we can write $V_{F,R} = G(1-\varphi)$, where $\varphi = 1-(1+F)(1-R)$ and measures the fractional reduction in genetic variance as a result of inbreeding, for the group in question. We shall call φ the equivalent inbreeding coefficient for this group.

Consider now the progeny tests. The structure of a test on each of the three main mating systems is shown in fig. 6, in the form of a path-coefficient diagram. Replicate tests were made on each inbred line of each inbreeding system, and the variances for each replicate were pooled.

The symbols in the diagrams have the usual meanings defined by Wright (cf. Li 1955). Only relations between genotypes are shown, squares and circles indicating the genotypes of males and females, respectively. It will be noted that m is the correlation between the genotypes of mates, s between those of full sibs, and M_1 between those of progeny from different matings in the same test. Only two such matings are shown, but there will normally be four in each test.

Suffix 1 refers to the progeny generation, and one and two primes refer to the Grand-parental (G.P.) and Great-grand-parental (G.G.P.) generations. Letters without prime or suffix refer to the generation of parents (P) in the test.

To make the test on D.F.C. mating, we take four males which are full sibs of each other and four females which are full sibs of each other from progeny in the two cultures of G.P., so that each male is a D.F.C. of each female. These males and females are pair-mated and form generation P, samples of progeny (O) of each mating being measured.

The regression of progeny on mid-parent thus measures the genetic fraction of the variance of a family of full sibs of generation P, whose parents have the normal relationship of the line in generation G.P., and this will apply to all the inbreeding systems. The expected value of this genetic variance is

$$V_{F,s} = G(1+F)(1-s)$$
$$\text{so that } \varphi_1 = 1-(1+F)(1-s)$$

is the equivalent inbreeding coefficient for the regression estimates of h^2.

In the analysis of variance of the progeny values, we have components of variance within matings (W), between matings (B) and their sum $T = B + W$. The component within cultures is V_{F_1, s_1}, and T is the variance of individuals from different matings, so that the correlation between their genotypes is M_1. The three components of variance will thus have the following expected values.

Expectations of components of variance

W: Within cultures (matings)	$G(1+F_1)(1-s_1)+E$
B: Between matings	$G(1+F_1)(s_1-M_1)$
T: $W+B$	$G(1+F_1)(1-M_1)$

where E is the environmental variance within cultures, assumed constant.

The following equations hold for all mating systems (Wright 1921, Li 1955):

$$b_1^2 = \tfrac{1}{2}(1+F), \quad a^2 = \tfrac{1}{2}/(1+F), \quad s_1 = 2a_1^2 b_1^2 (1+m)$$
$$m = 2F_1/(1+F), \quad (1-s_1) = (1-F)/2(1+F_1)$$

and fig. 6 shows that the equations for M_1 are:

$$\text{Full-sib mating:} \quad M_1 = 4a_1^2 b_1^2 m$$
$$\text{Half-sib mating:} \quad M_1 = 2a_1^2 b_1^2 (m+s)$$
$$\text{D.F.C. mating:} \quad M_1 = 2a_1^2 b_1^2 (m+s).$$

These equations all lead to the same formula

$$1 - M_1 = \frac{3-2F-F'}{4(1+F_1)}$$

The equivalent inbreeding coefficients can now be deduced immediately. For the regression estimate of h^2

$$\varphi_1 = 1-(1+F)(1-s) = \tfrac{1}{2}(1+F')$$

and for the components of variance of the progeny

$$W = \tfrac{1}{2}(1-F)G + E$$
$$B = \tfrac{1}{4}(1-F')G$$
$$T = \tfrac{1}{4}(3-2F-F')G + E.$$

T has lost a fraction $\varphi_2 = \tfrac{1}{4}(1+2F+F')$ of the initial genetic variance, so φ_2 is the equivalent inbreeding coefficient for the estimate of heritability calculated as $h^2 = \dfrac{3-2F-F'}{1-F'} \cdot \dfrac{B}{T}$.

References

Bateman, A. J., and K. Mather: The progress of inbreeding in barley. Heredity (Lond.) 5, 321 (1951). — Cockerham, C. C.: An extension of the concept of partitioning hereditary variance for analysis of covariances among relatives when epistasis is present. Genetics **39**, 859 (1954). — Dickerson, G. E., C. T. Blunn, A. B. Chapman, R. M. Kottman, J. L. Krider, E. J. Warwick and J. A. Whatley jr.: Evaluation of selection in developing inbred lines of swine. Univ. Missouri Columbia Res. Bull. **1954**, 551. — Fisher, R. A.: The correlation between relatives on the supposition of Mendelian inheritance. Trans. Roy. Soc. Edinburgh **52**, 399 (1918). — The Theory of Inbreeding. London: Oliver & Boyd 1949. — Gowen, J. W., J. Stadler and L. E. Johnson: On the mechanism of heterosis—the chromosomal or cytoplasmic basis of heterosis in *D. melanogaster*. Amer. Naturalist **80**, 506 (1946). — Haldane, J. B. S.: Some theoretical results of continued brother-sister mating. J. Genet. **34**, 265 (1937). — The conflict between inbreeding and selection. I Self-fertilisation J. Genet. **54**, 56 (1956). — Hayman, B. I., and K. Mather: The progress of inbreeding when homozygotes are at a disadvantage. Heredity (Lond.) **7**, 165 (1953). — Kerr, W. E., and S. Wright: Experimental studies of the distribution of gene frequencies in very small populations of *Drosophila melanogaster*. I. Forked. Evolution **8**, 172 (1954). — Li, C. C.: Population Genetics. Chicago: University of Chicago Press 1955. — Reeve, E. C. R.: Studies in quantitative inheritance. III. Heritability and genetic correlation in progeny tests using different mating systems. J. Genet. **51**, 520 (1953). — Inbreeding with the homozygotes at a disadvantage. Ann. Human. Genet. **19**, 332 (1955). — Inbreeding with selection and linkage. I. Selfing. Ann. Human. Genet. In press (1956a). — The effects of assortative mating on the regression of progeny on mid-parent. Population Genetics. Cold Spring Harbor. Symp. Quant. Biol. **20** (1956b). — Robertson, A.: The effect of inbreeding on the variation due to recessive genes. Genetics **37**, 189 (1952). — Robertson, F. W.: Selection response and the properties of genetic variation. Population Genetics. Cold Spring Harbor. Symp. Quant. Biol. **20** (1956). — Robertson, F. W., and E. C. R. Reeve: Studies in quantitative inheritance. I. The effects of selection of wing and thorax length in *Drosophila melanogaster*. J. Genet. **50**, 414 (1952). — Studies in quantitative inheritance. VII. Crosses between strains of different body-size in *Drosophila melanogaster*. Z. Vererbungslehre **86**, 424 (1955a). — Studies in quantitative inheritance. VIII. Further analysis of heterosis in crosses between inbred lines of *Drosophila melanogaster*. Z. Vererbungslehre **86**, 439 (1955b). — Shultz, F. T., and W. E. Briles: The adaptive value of blood group genes in chickens. Genetics **38**, 34 (1953). — Wright, S.: Systems of mating. I—V. Genetics **6**, 111 (1921). — The genetics of quantitative variability. In Quantiatative Inheritance, edit. E. C. R. Reeve and C. H. Waddington. London: H. M. Stationery Office 1952. — Wright, S., and W. E. Kerr: Experimental studies on the distribution of gene frequencies in very small populations of *Drosophila melanogaster*. II. Bar. Evolution **8**, 225 (1954).

Dr. E. C. R. Reeve, Institute of Animal Genetics, West Mains Road, Edinburgh 9

Zeitschrift für indukt. Abstammungs- und Vererbungslehre, Bd. 87, S. 668—693 (1956)

Aus dem Max-Planck-Institut für Biologie, Abteilung Kühn, Tübingen

ÜBER DIE ENTWICKLUNG DES BESTANDES AN FLUORESZIERENDEN STOFFEN IN DEN KÖPFEN VON *EPHESTIA KÜHNIELLA* IN ABHÄNGIGKEIT VON VERSCHIEDENEN AUGENFARBGENEN

Von

Eveline Reisener-Glasewald

Mit 17 Textabbildungen

(Eingegangen am 25. Juni 1956)

Inhalt

Seite

A. Einleitung 668
B. Material und Methodik 669
C. Ergebnisse 670
I. Qualitative Bestandsaufnahme mit Hilfe zweidimensionaler Chromatogramme . 670
1. Die Augenpigment führenden Rassen 675
2. Die weißäugige Rasse 676
II. Intensitätsmessungen der Fluoreszenz auf eindimensionalen Chromatogrammen 677
1. Die Fluoreszenzkurven der Puppenköpfe 677
2. Die Fluoreszenzkurven der Imagoköpfe 679
III. Die Fluoreszenzintensität einzelner Stoffe auf zweidimensionalen Chromatogrammen 681
1. Zur chemischen Natur der fluoreszierenden Stoffe 681
2. Fluorometrische Bestimmung von Isoxanthopterin und Riboflavin 681
3. Besprechung der Riboflavin- und Isoxanthopterinkurven 683
IV. Chromatographie isolierter Augen und Gehirne 684
V. Histologische Untersuchung der Augenentwicklung 686
1. Allgemein, mit Berücksichtigung der Ergebnisse früherer Autoren 686
a) Der Zellenverband 687
b) Das Pigment 688
2. Fluoreszenzmikroskopische Untersuchung 689
VI. Vergleichende Betrachtung der Chromatogramme und der histologischen Präparate 691
Zusammenfassung 692
Literatur 692

A. Einleitung

Hadorn und Kühn (1953) fanden bei papierchromatographischen Untersuchungen an *Ephestia kühniella* eine Anzahl fluoreszierender Substanzen in den Köpfen der Imagines. Es stellte sich heraus, daß die Bildung dieser fluoreszierenden Stoffe von Augenfarbgenen bedingt wird und daß jede daraufhin untersuchte mutative Änderung der Augenfarbe mit einer für sie charakteristischen Abwandlung des Fluoreszenzmusters in den Köpfen einhergeht. Hier wurde also eine biochemische Polyphänie der für die Augenfarbe verantwortlichen Gene aufgedeckt, die für die biochemische Analyse der Genwirkungen wertvolle Ansatzpunkte liefert.

Die Aufgabe der vorliegenden Arbeit besteht darin, die Veränderungen des Gehaltes an fluoreszierenden Stoffen in den *Ephestia*-Köpfen während der Imaginalaugenentwicklung zu untersuchen und mit der Histogenese vergleichend zu be-

trachten. Durch Verwendung mehrerer Augenfarbrassen sollte gleichzeitig das verschiedenartige Eingreifen der die Augenfarbe bedingenden Gene in den Entwicklungsablauf veranschaulicht werden.

Herrn Professor Dr. Alfred Kühn, meinem hochverehrten Lehrer, danke ich für die Anregung dieser Arbeit und für seine stete Anteilnahme.

B. Material und Methodik

Für die Untersuchungen wurden folgende vier Zuchtstämme verwendet:

1. ein Stamm mit wildfarbigen braunschwarzen Augen („*Sb*“, das bedeutet „Schattenbinde“ auf den Flügeln), kurz mit + bezeichnet;
2. ein helläugiger Stamm, der den Faktor *a* homozygot enthält („hellgelb“, Kühn 1948);
3. ein tief schwarzäugiger Stamm mit dem homozygot vorhandenen Gen *bch* („biochemica“, Hadorn und Kühn 1953);
4. Ein weißäugiger Stamm mit dem homozygoten Faktor *wa* neben dem hier kryptomeren Gen a^+ (Kühn 1941).

Die Tiere wurden im Dunkeln bei 19,5° C gezüchtet. Bei dieser Temperatur dauert die Puppenruhe und damit die Imaginalaugenentwicklung 16—19 Tage. Es wurden daher Puppen im Alter von 0—16 Tagen sowie Imagines für die Versuche herangezogen.

Die Anfertigung der Papierchromatogramme erfolgte in der Hauptsache nach den von Hadorn und Mitchell (1951) und von Hadorn und Kühn (1953) angegebenen Methoden.

In den vorliegenden Versuchen wurden sowohl eindimensionale als auch zweidimensionale Chromatogramme angefertigt. Für die eindimensionalen konnten die unmittelbar hinter der Augenregion abgeschnittenen Puppenköpfe und die abgetrennten Imaginalköpfe sofort (ungekocht) einzeln auf der Startlinie des Papierblattes zerdrückt werden. Für die zweidimensionalen Chromatogramme verwendete ich Extrakte aus je 20 Köpfen. Diese Extrakte wurden auf verschiedenen Wegen gewonnen. Für die allgemeine qualitative Bestandsaufnahme der fluoreszierenden Stoffe dienten wäßrige Auszüge. Die Köpfe wurden erst kurz in destilliertem Wasser aufgekocht, dann zerrieben und von der Flüssigkeit abzentrifugiert. Dann dampfte ich den Extrakt rasch unter Zufuhr von Druckluft im kochenden Wasserbad ein, nahm ihn mit einem Tropfen der nachher zur Entwicklung der Chromatogramme verwendeten Propanol-Ammoniaklösung auf und brachte ihn auf das Papier. Für die quantitativen Untersuchungen des Isoxanthopterins und des Riboflavins wurden in Anlehnung an Busnel und Drilhon (1942) die Köpfe in 55%igem Methanol zerrieben und 24 Std lang bei 40—45° C extrahiert. Der Auszug wurde eingeengt und mit einem neuen Tropfen 55%igen Methanols wieder gelöst und aufgetragen. Die von Bodine und Fitzgerald (1947) gegen diese Methode vorgebrachte Einwendung, daß Methanol selbst fluoresziere, kann nicht aufrechterhalten werden.

Sämtliche Chromatogramme wurden mit Whatman-No.1-Papier hergestellt und aufsteigend entwickelt. Als Lösungsmittel diente für die eindimensionalen und für die erste Dimension der zweidimensionalen Chromatogramme eine Mischung aus n-Propanol und 1%iger wäßriger Ammoniaklösung im Verhältnis 2:1, für die zweite Dimension wassergesättigtes Collidin.

Um etwaige Veränderungen der fluoreszierenden Stoffe durch photochemische Reaktionen zu verhüten, wurden alle chromatographischen Arbeiten sehr rasch oder bei Rotlicht ausgeführt, die auf Riboflavin gerichteten Untersuchungen unter strengsten Dunkelbedingungen. Die Entwicklung der Chromatogramme erfolgte bei einer Temperatur von 17—21° C.

Der Bestand an fluoreszierenden Substanzen wurde im Licht einer gewöhnlichen Analysenlampe festgestellt. Eine quantitative Auswertung auch größerer Chromatogrammserien war mit Hilfe eines für die Papierchromatographie entwickelten Fluorometers möglich (Kühn 1955). Ich verwendete für meine Messungen eine Spaltbreite von 2 mm, so daß also das ganze Chromatogramm in 2 mm breite Abschnitte aufgeteilt wurde, deren Fluoreszenzintensität jeweils durch einen Skalenwert charakterisiert ist. Das vom Lösungsmittel durchlaufene Papier gibt schon von sich aus einen geringen Galvanometerausschlag. Da auf den eindimensionalen Chromatogrammen die Blindwerte des Papiers in Richtung auf die Frontlinie der Entwicklungslösung zunehmen, wurde von allen Blättern je ein Blindstreifen durchgemessen und eine durchschnittliche Nullwertreihe ermittelt. Die gesamte Laufstrecke des

Lösungsmittels von der Startlinie ab betrug 12,5 cm. Für die Fluoreszenzmessungen an zweidimensionalen Chromatogrammen wurden die betreffenden Flecke ausgeschnitten und mit ihnen jeweils gleich große Blindflecke aus demselben Chromatogramm vermessen. Die Differenz zwischen den Fluoreszenzintensitäten des leeren und des substanzführenden Papiers ergibt den Fluoreszenzwert des reinen Stoffes.

Für die in den vorliegenden Messungen vorkommenden Stoffkonzentrationen und angewandten Lösungsmittel herrscht zwischen den Galvanometerwerten und den Substanzmengen jedenfalls eine annähernd lineare Beziehung.

Für die parallel laufenden histologischen Untersuchungen fixierte ich die Puppenköpfe ausschließlich im Gemisch nach Carnoy (6 Teile absoluter Alkohol, 3 Teile Chloroform, 1 Teil Eisessig). Die Wasserlöslichkeit der fluoreszierenden Stoffe machte ganz wasserfreies Arbeiten erforderlich. Die Einbettung erfolgte nach der Celloidin-Paraffinmethode von Apathy. Die 5—6 μ dicken Schnitte wurden auf Anilin gestreckt und ungefärbt mit Euparal eingedeckt.

C. Ergebnisse

I. Qualitative Bestandsaufnahme mit Hilfe zweidimensionaler Chromatogramme

Die Anordnung der fluoreszierenden Stoffe auf den zweidimensionalen Chromatogrammen ist aus Abb. 1—4 ersichtlich. Beim letzten Stadium ist jeweils noch das entsprechende eindimensionale Chromatogramm links eingezeichnet. Das Puppenalter ist in Tagen angegeben; auf den Koordinaten, die gleichzeitig die Startlinien darstellen, sind die mittleren R_f-Werte aufgetragen (waagerecht Startlinie der Propanol-Ammoniaklösung, senkrecht Startlinie des Collidins). In der Signatur für die einzelnen Farben richtete ich mich nach Hadorn und Kühn. Da die chemische Struktur der fluoreszierenden Stoffe bei ihrem Auffinden noch nicht bekannt war, führten Hadorn und Kühn (1953) die Bezeichnungsweise mit kleinen Buchstaben ein.

Es kommen in meinen Chromatogrammen im ganzen 13 getrennte Flecke vor, die im UV-Licht in verschiedenen Farben aufleuchten: blau (g, i, k), blaß-hellblau (m), eisblau (c, e, f_1), blaugrün (h, x), grün (f_2, l), gelbgrün (Ri) und orange (b). In den Chromatogrammen, die nicht mit wäßrigen, sondern mit methanolischen Extrakten angefertigt wurden (Abb. 4), erscheint die sonst orangefarbene Fluoreszenz (b) wesentlich gelber. Die Flecke erscheinen nicht gleichzeitig in der Entwicklung der Puppen. Auch können in den Puppenköpfen Stoffe auftreten, die vor dem Schlüpfen der Imagines wieder verschwinden. Der i-Fleck kann im selben Puppenalter vorhanden sein oder fehlen; k kann sich in späten Puppenstadien in 2 Flecke (k_1 und k_2) gliedern.

Der Bestand an fluoreszierenden Stoffen in den wäßrigen Extrakten (Abb. 1—3) zeigte bei meinen Untersuchungen einige Abweichungen von dem von Hadorn und Kühn angegebenen. Vermutlich ist dies auf die zweifellos vorkommenden geringen Unterschiede zwischen einzelnen Stämmen der gleichen Augenfarbe zurückzuführen. Eine Rolle spielt vielleicht auch die größere Stoffkonzentration in meinen Chromatogrammen, für die ich je 20 Köpfe extrahierte. Hadorn und Kühn verwendeten jeweils nur 10—12 Köpfe. Es handelt sich um folgende Differenzen: In meinen Chromatogrammen fehlen stets die Flecke a und d. Dagegen ist der bei Hadorn und Kühn nur nach eindimensionaler Entwicklung schwach sichtbare Fleck l hier auch in den zweidimensionalen Chromatogrammen von wild und *bch* relativ groß und intensiv. Der Fleck f erwies sich beim Wildstamm eindeutig als aus 2 Komponenten (f_1 = eisblau und f_2 = grün) zusammengesetzt, wie Hadorn und Kühn schon vermuteten. In den Imaginalköpfen von *a* (hellgelb) fand ich nur die Komponente f_1, bei *bch* stets die Komponente f_2.

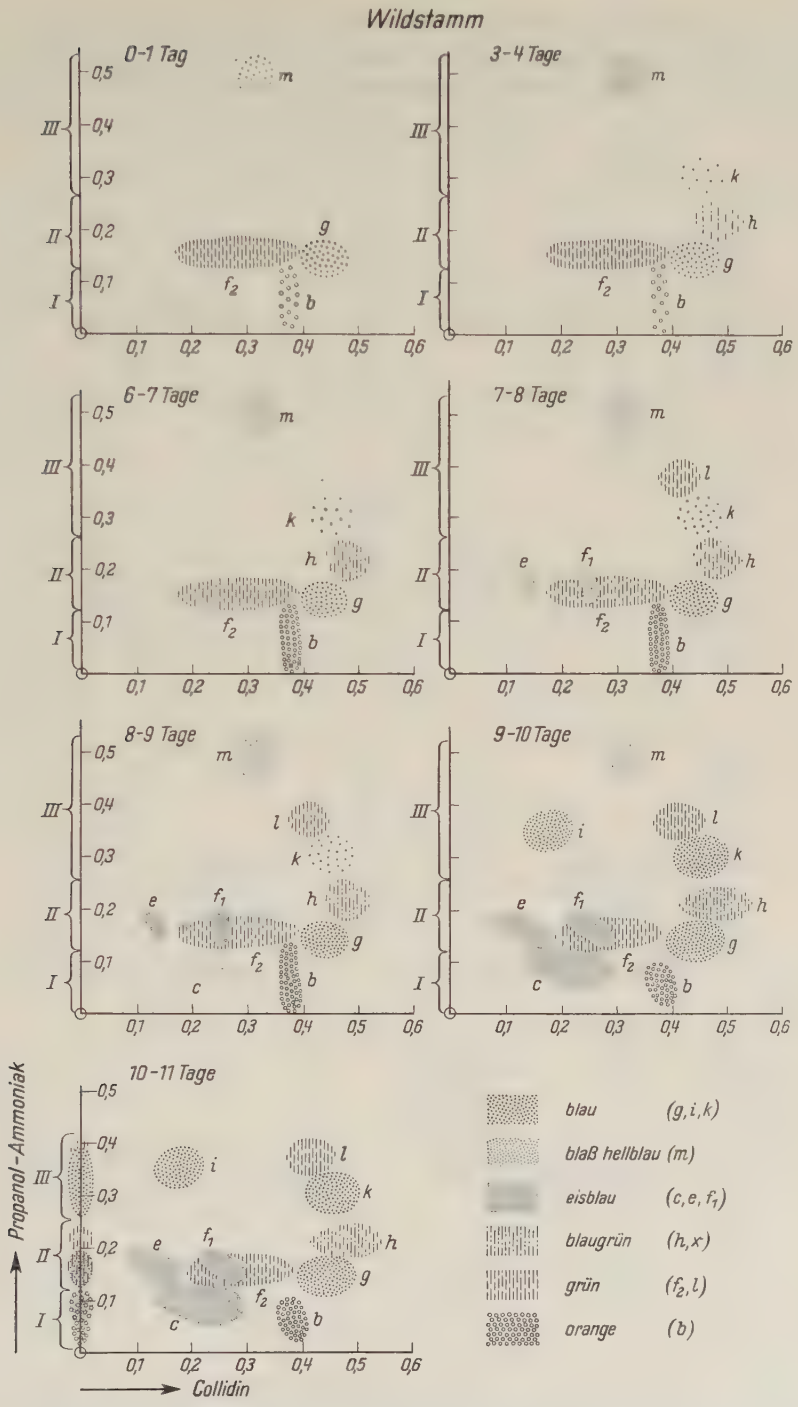


Abb. 1. Anordnung der fluoreszierenden Stoffe auf den Chromatogrammen wildfarbiger *Ephestia*-Köpfe verschiedenen Alters. H_2O-Extrakte. Tagesangaben: Zeitspanne nach der Verpuppung, *I—III*: Fleckengruppen der eindimensionalen Chromatogramme. Aufgelockerte Signaturen zeigen an, daß die Flecke nur undeutlich zu sehen sind

In den methanolischen Extrakten fehlten ebenfalls die Stoffe a und d, aber auch die beiden grün fluoreszierenden Substanzen f_1 und l waren niemals darin enthalten. Das Neue bei dieser Auszugsmethode ist die Gewinnung des gelb-

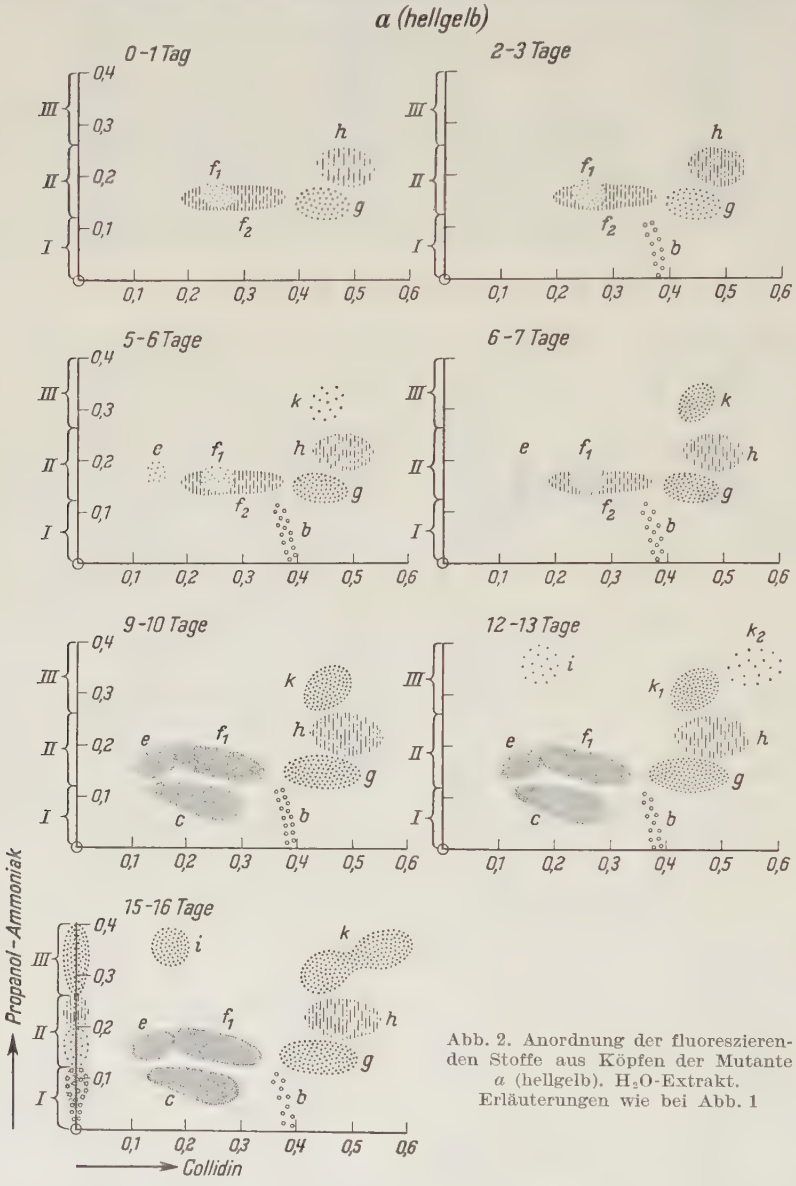


Abb. 2. Anordnung der fluoreszierenden Stoffe aus Köpfen der Mutante *a* (hellgelb). H_2O-Extrakt. Erläuterungen wie bei Abb. 1

grünen Fleckes (Ri, vgl. S. 676), der bei der Imaginalaugenentwicklung aller untersuchten Genotypen vorübergehend erscheint.

Nachdem HADORN und KÜHN das Fluoreszenzmuster in den Köpfen der Imagines untersucht hatten, war es von Belang zu erfahren, wie es sich im Verlauf der Puppenruhe entwickelt und in welche Bahnen die verschiedenen Augenfarbgene seine Ausbildung lenken. Es ergab sich, daß die Köpfe der jungen Puppen

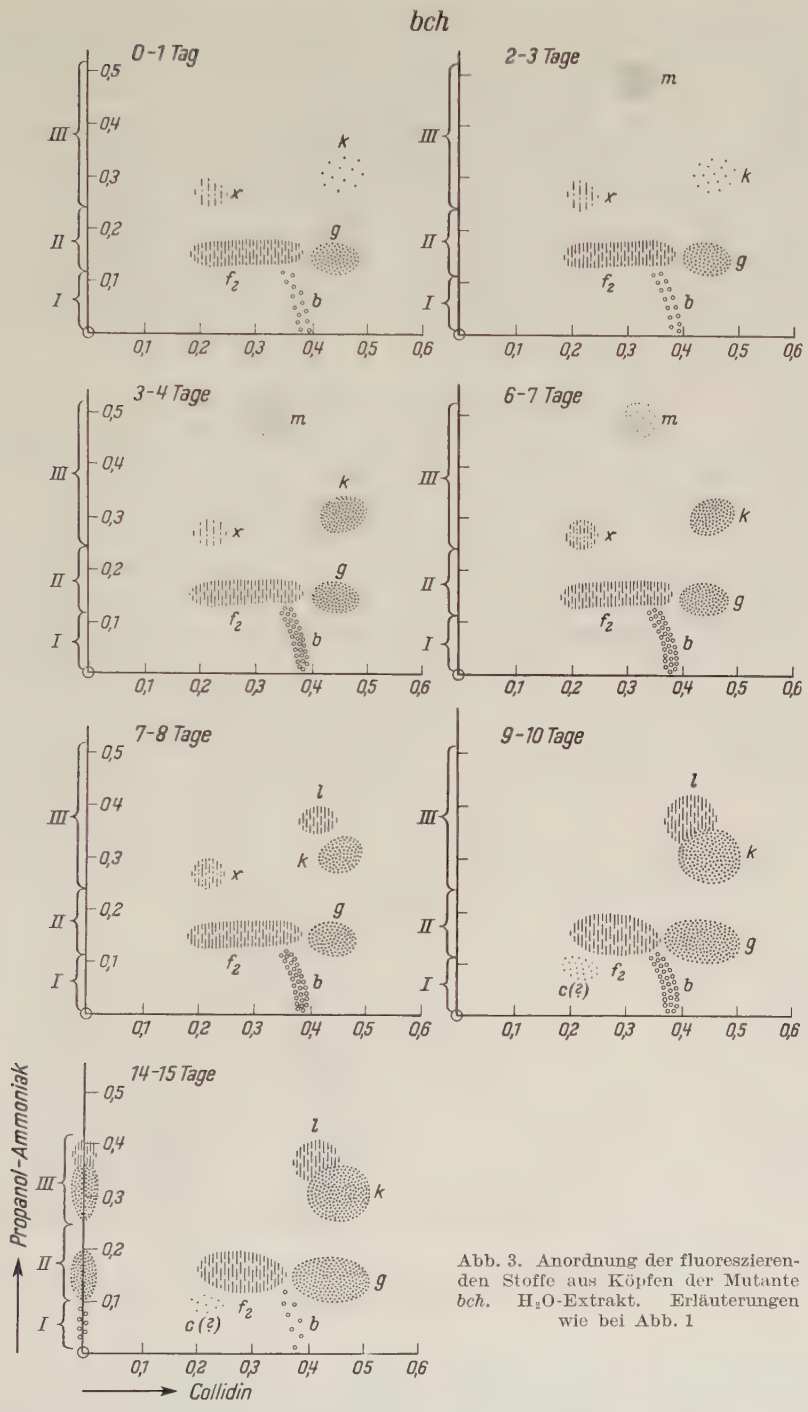


Abb. 3. Anordnung der fluoreszierenden Stoffe aus Köpfen der Mutante *bch*. H_2O-Extrakt. Erläuterungen wie bei Abb. 1

nur eine sehr schwache Fluoreszenz auf dem Papier hervorbringen, daß zunächst noch nicht alle fluoreszierenden Stoffe vorkommen und daß die sichtbaren Flecke

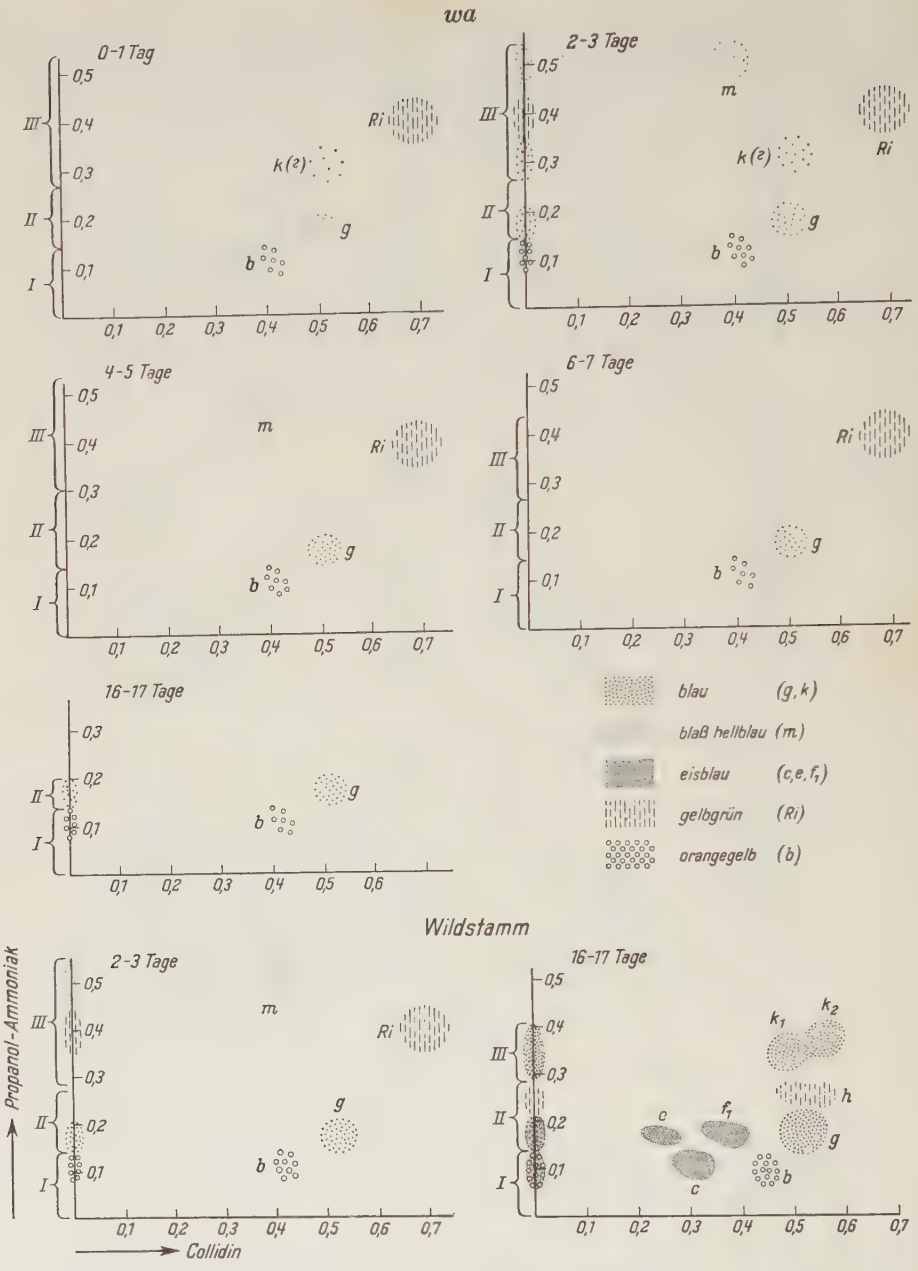


Abb. 4. Anordnung der fluoreszierenden Stoffe aus Köpfen der Mutante *wa* und des Wildstammes zum Vergleich. CH_3OH-Extrakt. Erläuterungen wie bei Abb. 1

kleiner sind als bei den Imaginalköpfen. Man kann ein allmähliches Größer- und Intensiverwerden der Flecke und eine Zunahme der Fleckenanzahl während der Augenentwicklung verfolgen. In Abb. 1—4 sind für die Fleckenform und -größe Durchschnittswerte angegeben. Bis zum 10. Tag, an dem der steile Intensitäts-

anstieg einsetzt, ist die Größe der Flecke bei den aufeinanderfolgenden Entwicklungsstadien annähernd gleich. Von dann ab nimmt mit der Konzentration auch die Flächenausbreitung der fluoreszierenden Stoffe stärker zu.

In den Abb. 1—4 sind die Umrisse der Flecke schematisch als Mittelwert wiedergegeben. Die mittleren Umrisse wurden aus den Flecken der Altersstufen zwischen 0 und 9 Tagen einerseits und derjenigen zwischen 9 und 17 Tagen (bzw. Imagines) andererseits gewonnen. Das Intensiverwerden der Flecke ist durch die Dichte der Signaturen gekennzeichnet.

Bei der Betrachtung der zweidimensionalen Chromatogramme auf den Abb. 1—4 ist darauf zu achten, daß nur die der Abb. 1—3 direkt miteinander vergleichbar sind. Sie beruhen auf wäßrigen Auszügen der Köpfe und enthalten daher nicht den Fleck Ri, dessen Vorkommen noch besonders behandelt wird. Den Chromatogrammen der Abb. 4 liegt methanolische Extraktion zugrunde.

1. Die Augenpigment führenden Rassen

Vergleicht man auf den Abb. 1—3 die fluoreszierenden Stoffe aus den 0—1 Tag alten Puppenköpfen der 3 Augenfarbrassen (+, *a* und *bch*) miteinander, so findet man noch weitgehende Übereinstimmung. Deutlich sind jeweils nur die Flecke f_2 (grün) und g (blau). Doch ist schon an schwachen Spuren zu erkennen, in welcher Weise die Fluoreszenzmuster der 3 Genotypen alsbald auseinanderstreben werden. In der Regel kündigt sich das klar erkennbare Auftreten eines Flecks schon in den Chromatogrammen vorhergehender Entwicklungsstadien durch einen blassen Schimmer an, und die Intensität wächst stetig, bis ein verhältnismäßig deutlich umrissener, farblich gut definierbarer Fleck erscheint. Die hier im folgenden gegebene Übersicht über das Neuauftreten fluoreszierender Stoffe im Entwicklungsablauf berücksichtigt nur diejenigen Stoffkonzentrationen, die schon deutliche Flecke hervorrufen. Auf den Abbildungen sind auch schwächere Spuren verzeichnet, kenntlich durch lockerere Signaturen.

Wildstamm. Beim Wildstamm werden deutlich sichtbar:

am 1. Tag die Flecke f_2 (grün) und g (blau),

am 4. Tag ein blaß-hellblauer, von mir mit m bezeichneter Fleck mit besonders hohem R_f-Wert im Propanolammoniak,

am 7. Tag die Flecke b (orange) und h (blaugrün),

am 8. Tag der grüne Fleck l,

am 9. Tag die beiden eisblauen Flecke e und f_1 und

am 10. Tag Fleck c (eisblau) und die blauen Flecke i (unregelmäßig) und k.

Am 11. Tag verschwindet der hellblaue Fleck m, und damit ist das Fluoreszenzmuster der Imaginalköpfe fertiggestellt. Von jetzt ab ist nur noch ein Fluoreszenzanstieg und geringfügiges Größerwerden der Fluoreszenzflecke, bisweilen das Auftreten eines zweiten Zentrums in k (blau) als k_2 (Abb. 4) zu beobachten.

Mutante a. Bei der helläugigen Mutante *a* (hellgelb) zeigt sich der folgende Verlauf. Klar erkennbar werden:

am 1. Tag die Flecke f_2 (grün) und g (blau),

am 3. Tag bereits der blaugrüne Fleck h,

am 7. Tag Fleck k (blau),

am 10. Tag gleichzeitig alle 3 eisblauen Flecke (c, e, f_1), wogegen Fleck f_2 von diesem Tage an ausbleibt (Hadorn und Kühn fanden ihn auch bei Imagines),

am 14. Tag Fleck k_2 (unregelmäßig),

am 16. Tag Fleck i (unregelmäßig).

Fleck b (orange) bleibt bei diesem Stamm immer nur schwach sichtbar, die bei der Wildform auftretenden Flecke l (grün) und m (hellblau) fehlen ganz.

Mutante bch. Die Mutation *biochemica* ändert das Fluoreszenzmuster in den Köpfen noch stärker ab. Es erscheinen deutlich:

am 1. Tag die Flecke f_2 (grün) und g (blau),
am 3. Tag Fleck m (blaß-hellblau),
am 4. Tag schon die Flecke b (orange) und k (blau),
am 7. Tag ein fragwürdiger, hier mit x bezeichneter blaugrüner Fleck und
am 8. Tag Fleck l (grün).
Dann verschwinden wieder:
am 10. Tag Fleck x (blaugrün) und
am 15. Tag Fleck b (orange), so daß das Fluoreszenzmuster der *bch*-Imaginalköpfe nur noch aus 4 Stoffen besteht, von denen f_2 stammeseigen sein dürfte, da er bei dem von HADORN und KÜHN untersuchten *bch*-Stamm fehlte. Die bei wild und *a* auftretenden Flecke e, f_1, h und i erscheinen überhaupt nicht. Fleck e kommt vielleicht vom 10. bis zum 15. Puppentag mit äußerst geringer Leuchtintensität vor, doch ist bei der so sehr schwachen Fluoreszenz auch die Farbe nicht genau bestimmbar.

2. *Die weißäugige Rasse*

Bei der weißäugigen Mutante *wa* (Abb. 4) geht mit dem Ausbleiben der Augenpigmentbildung eine sehr weitgehende Reduktion der fluoreszierenden Stoffe in den Köpfen einher. Extrakte mit destilliertem Wasser erbrachten nur so geringe Fluoreszenzspuren, daß hiermit keine einwandfreie Beurteilung der Entwicklung des Fluoreszenzmusters möglich war. Schon wesentlich bessere Ergebnisse lieferte die Extraktion mit Propanolammoniak. Dabei zeigte es sich, daß in den Köpfen der *Ephestia*-Puppen auch sehr kleine Mengen eines gelbgrün fluoreszierenden Stoffes vorhanden sein können, die in den wäßrigen Auszügen unbemerkt geblieben waren. Im Gegensatz zu den anderen Substanzen konnte dieser Stoff auf Grund seiner Fluoreszenzfarbe und seiner R_f-Werte als bekannte chemische Verbindung, nämlich als *Riboflavin*, angesprochen werden. Er erhielt daher das Symbol „Ri" anstelle eines kleinen Buchstabens. Da das Riboflavin wohl mindestens teilweise in gebundener Form vorliegt (vgl. BUSNEL und DRILHON 1942), in der es nicht fluoresziert, und da es sich außerdem in Wasser schwer löst, ist leicht einzusehen, daß es bei der bisher üblichen Aufarbeitung der *Ephestia*-Köpfe nicht gefaßt werden konnte. Um es möglichst vollständig zu gewinnen, muß man für die quantitative Befreiung des gebundenen Riboflavins sorgen. Dies geschieht bei der von BUSNEL und DRILHON (1942) angegebenen Extraktion mit 55%igem Methanol. Diese Methode konnte für die Anfertigung der Chromatogramme übernommen werden, da sie auch alle anderen bei *wa* vorkommenden Fluoreszenzstoffe zugänglich macht. Während wäßrige Auszüge von *wa*-Köpfen nur den blau fluoreszierenden Fleck deutlich erscheinen lassen, den auch HADORN und KÜHN (1953) schon feststellten, enthalten die Methanolextrakte auch stets den orangegelb aufleuchtenden Stoff b und in jungen Stadien neben Riboflavin (Ri) auch noch Spuren der Stoffe m und k(?). Der reichhaltigste Bestand findet sich bereits in den Köpfen 2–3 Tage alter Puppen. Bei der nun folgenden Übersicht über das Neuerscheinen und Wiederschwinden der fluoreszierenden Stoffe im

Entwicklungsverlauf sind in Anbetracht der durchweg sehr geringen Konzentrationen auch definierbare Spuren schon erwähnt.

Bei der *Mutante wa* sind zu erkennen:

am 1. Tag die Flecke b (orangegelb), g (blau), ein Fleck am Platz von k (blau) und das Riboflavin (gelbgrün),

am 3. Tag zusätzlich noch Fleck m (blaß-hellblau),

am 5. Tag das Verschwinden von Fleck k,

am 17. Tag das Ausbleiben des Riboflavinfleckes, so daß in den Köpfen schlüpfreifer Puppen und Imagines nur noch 2 fluoreszierende Stoffe, b und g, vorkommen. Der Fleck b ist manchmal in 2 kleinere Flecke aufgespalten.

II. Intensitätsmessungen der Fluoreszenz auf eindimensionalen Chromatogrammen

Auf den zweidimensionalen Chromatogrammen der Abb. 1—3 wurden die Fluoreszenzstoffbestände nur qualitativ erfaßt. Zum allgemeinen quantitativen Vergleich zwischen den einzelnen Entwicklungsstadien und Augenfarbrassen dienten eindimensionale Chromatogramme. Sie lassen sich rascher in größerer Zahl anfertigen und auswerten, und da die Gefahr bestand, daß sich die fluoreszierenden Stoffe allmählich chemisch verändern, war schnelles, serienmäßiges Arbeiten notwendig. Chromatogramme, die nicht sofort nach dem Aufquetschen der Köpfe entwickelt worden waren, sondern aus technischen Gründen erst einen bis mehrere Tage lang (im Dunkeln) aufbewahrt worden waren, wiesen niedrigere R_f-Werte auf als die gleich weiterverarbeiteten. Diese Ungleichheit konnte durch prozentuale Korrekturen beseitigt werden. Bei der quantitativen Auswertung eindimensionaler Chromatogramme können nicht für jeden einzelnen Fleck Mengenangaben erhalten werden, da sich ja hier meist noch mehrere Substanzen übergreifen (vgl. Abb. 1—3, unten links). Hier erwies sich wieder die schon von Hadorn und Kühn angegebene Einteilung des Chromatogramms in 3 Fleckengruppen als nützlich.

Die Messung der Fluoreszenzintensitäten auf den Chromatogrammstreifen erfolgte mit dem Fluorometer. Die Meßergebnisse der 2 mm breiten Teilstücke ergaben für jedes Entwicklungsstadium und für jede Augenfarbrasse Kurven mit charakteristischem Verlauf. Den in Abb. 5—9 wiedergegebenen Kurven liegen die durchschnittlichen Meßwerte von je 5 Einkopfchromatogrammen zugrunde.

Den 3 Fleckengruppen der eindimensionalen Chromatogramme entsprechen die 3 Gipfel der Meßkurven. Gruppe I umfaßt die Flecke b und c, Gruppe II die Flecke e—h und Gruppe III die Flecke i—m sowie x, soweit die betreffenden Flecke jeweils vorhanden sind. Die Intensität von Riboflavin und Stoff m war auf den Einkopfchromatogrammen so gering, daß sie mit dem Fluorometer nicht erfaßt werden konnte. Die Kurven brauchten daher nur bis zu einem Abstand von 52 mm vom Startpunkt gezeichnet zu werden. Das entspricht einem R_f-Wert von 0,415.

1. Die Fluoreszenzkurven der Puppenköpfe

Die Augenpigment bildenden Stämme. Allen 3 Augenpigment bildenden Stämmen gemein ist der anfänglich äußerst niedrige Fluoreszenzwert und das im Puppenalter von etwa 7—8 Tagen einsetzende, stetige Ansteigen der Intensität, das bis zur Schlüpfreife der Puppen andauert (Abb. 5—7). Unterschiede zwischen

den Stämmen treten von dem Augenblick an in Erscheinung, in dem sich aus dem flachen Kurvenverlauf Gipfel zu erheben beginnen. Schon an den Kurven der 10—11 Tage alten Puppen (Abb. 8) sind ganz klar die wesentlichen Züge zu er-

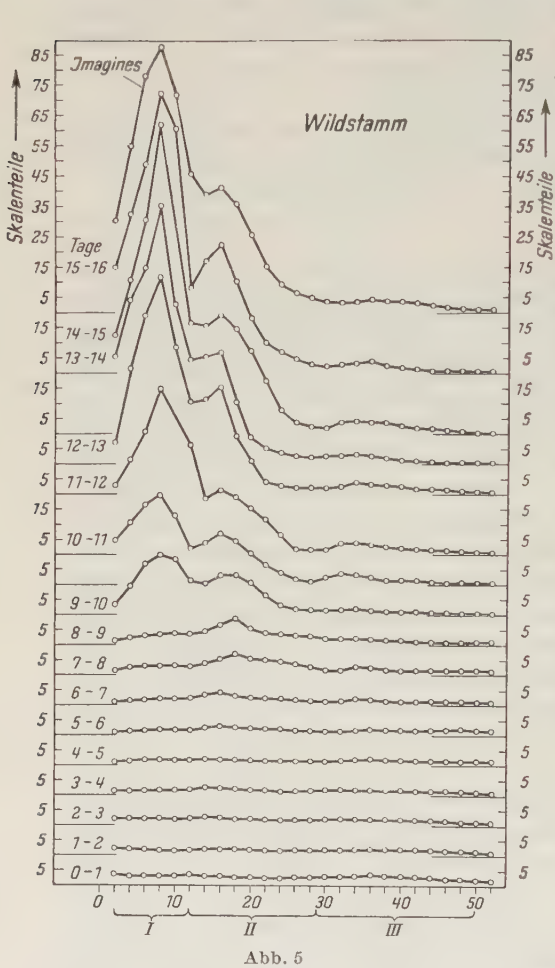


Abb. 5

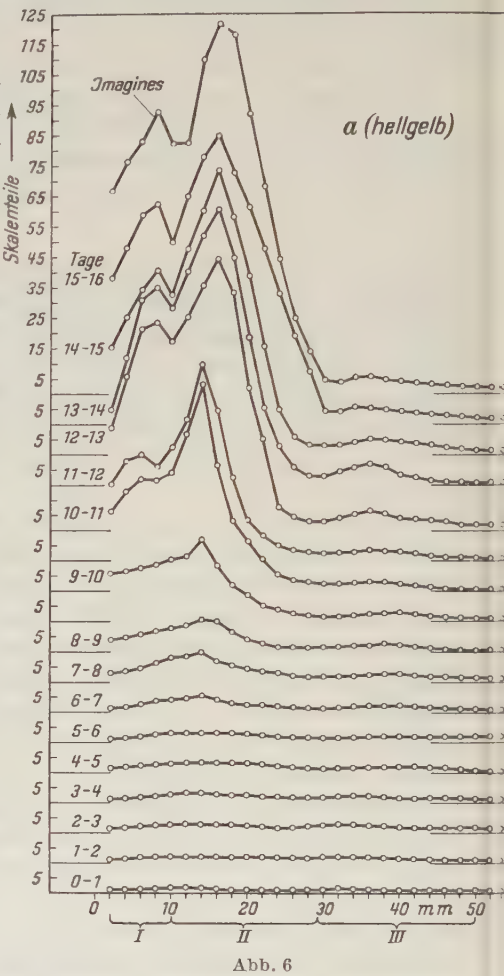


Abb. 6

Abb. 5. Fluorometerkurven eindimensionaler Chromatogramme von Puppen- und Imaginalköpfen des Wildstamms. Das Puppenalter ist in Tagen angegeben. Die Nullpunkte für die aufeinanderfolgenden Kurven sind an der Ordinate hinaufverschoben. *I—III*: Fleckengruppen

Abb. 6. Fluorometerkurven eindimensionaler Chromatogramme von Puppen- und Imaginalköpfen der Mutante *a*. Erläuterungen wie bei Abb. 5

kennen, in welchen sich die imaginalen Fluoreszenzkurven der 3 Augenfarbrassen unterscheiden.

Der weißäugige Stamm. Beim weißäugigen Stamm bleibt die Kurve der Fluoreszenzintensität immer sehr niedrig. Der einzige, sehr sanfte Gipfel, den die beiden hier allein erfaßbaren Flecke b und g zusammen bilden, erreicht erst im Puppenalter von 12—13 Tagen eine Höhe von 6 Skalenteilen und sinkt im Laufe der weiteren Entwicklung sogar wieder ab. Auf Abb. 8, die auch die Kurve für 10—11 Tage alte *wa*-Puppen zeigt, sieht man deutlich, wie stark sich der hem-

mende Einfluß des die Pigmentbildung störenden Gens *wa* auch auf die Synthese der fluoreszierenden Stoffe auswirkt.

2. Die Fluoreszenzkurven der Imagoköpfe

Die Kurven der Imagines sind in Abb. 9 zusammengestellt.

Wildstamm. Der Wildstamm zeigt in Fleckengruppe I ein mehr als doppelt so hohes Maximum wie in Gruppe II. Das Maximum der Fleckengruppe III ist verschwindend klein, obwohl man kräftiges blaues Fluoreszenzlicht wahrnimmt. Das vor die Photozelle des Fluorometers geschaltete UV-Sperrfilter fängt einen Teil des blauen Lichtes ab.

Mutante a. Die helläugige Mutante *a* weist einen außerordentlichen Fluoreszenzanstieg in der Fleckengruppe II auf, während die Maxima in den Gruppen I und III nicht wesentlich von denen des Wildstammes abweichen. Nach dem Farbeindruck (vgl. Kühn und Berg 1955, Abb. 7) und der Fleckengröße auf den zweidimensionalen Chromatogrammen zu urteilen, ist in erster Linie eine Vermehrung

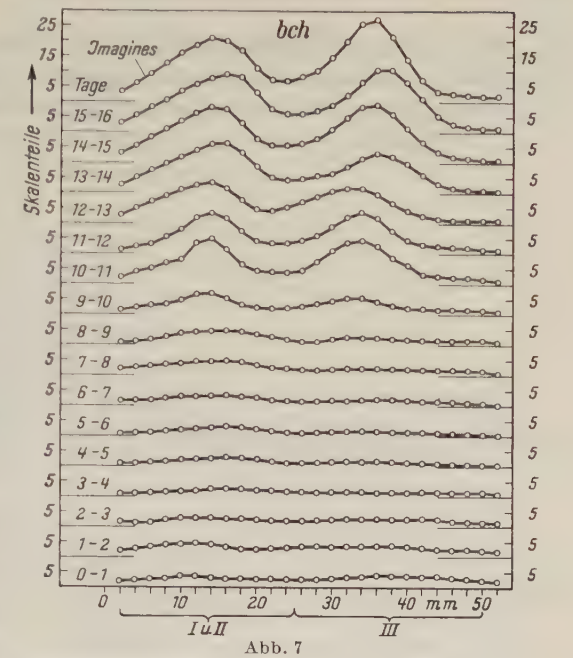


Abb. 7

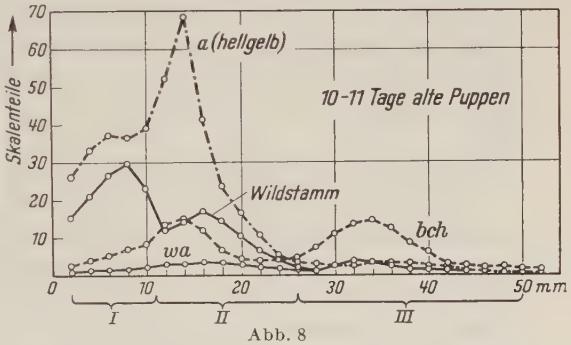


Abb. 8

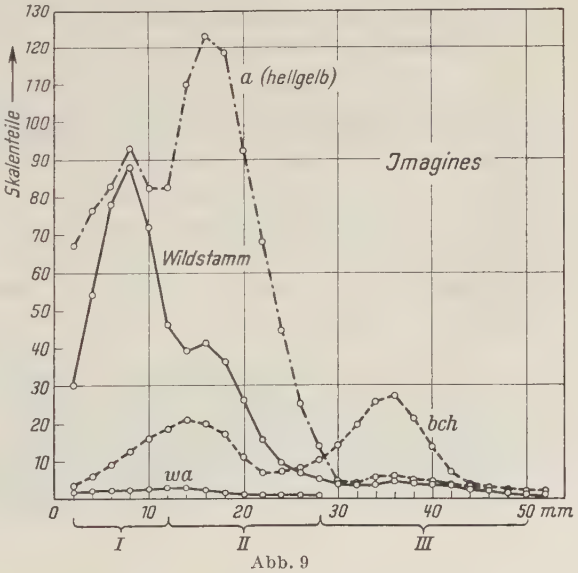


Abb. 9

Abb. 7. Fluorometerkurven eindimensionaler Chromatogramme von Puppen- und Imaginalköpfen der Mutante *bch*. Erläuterungen wie bei Abb. 5

Abb. 8. Fluorometerkurven eindimensionaler Chromatogramme von 10 bis 11 Tage alten Puppenköpfen der 4 Augenfarbrassen Wildstamm, *a*, *bch* und *wa*

Abb. 9. Fluorometerkurven eindimensionaler Chromatogramme von Imaginalköpfen der 4 Augenfarbrassen Wildstamm, *a*, *bch*, und *wa*

des eisblau fluoreszierenden Stoffes f_1 für den besonders hohen Gipfel der Gruppe II verantwortlich. Daneben weisen aber auch alle anderen Substanzen der Gruppe II eine Konzentrationserhöhung auf, wie aus den Untersuchungen von HADORN und KÜHN (1953) hervorgeht.

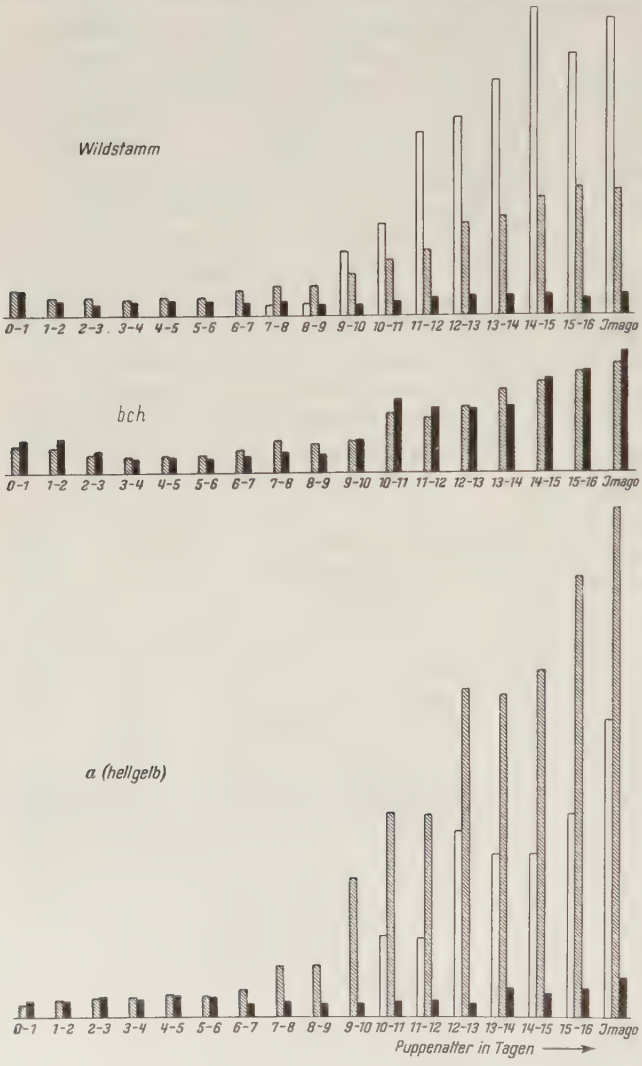


Abb. 10. Fluoreszenzintensität der 3 Fleckengruppen auf den eindimensionalen Chromatogrammen. Fleckengruppen I (weiß), II (schraffiert) und III (schwarz)

Mutante bch. Bei der schwarzäugigen Mutante *biochemica* ist die Fluoreszenzintensität der Fleckengruppe I (Stoffe b und c?) so schwach, daß sie nicht gesondert zur Geltung kommt. Das erste Maximum dieser Kurve beruht auf der Fleckengruppe II. Es liegt weit unter den ersten beiden Gipfeln der vorher genannten Stämme. Das ist gut erklärlich aus der Tatsache, daß ja *bch* nur sehr wenige fluoreszierende Stoffe bildet, so daß in der Gruppe II lediglich die Flecke f_2 und g auftreten. Demgegenüber ist die Menge der Stoffe k und l hier so groß, daß das Maximum der Fleckengruppe III das der anderen Stämme um ein Vielfaches übertrifft.

Mutante wa. Die Beeinträchtigung der Bildung fluoreszierender Stoffe durch die Mutation *wa* kommt bei der Gegenüberstellung der Imaginalkurven noch schärfer zum Ausdruck als auf Abb. 8.

3. Die Gesamtfluoreszenz der Fleckengruppen

Die Gesamtfluoreszenz der einzelnen Fleckengruppen ist in Abb. 10 veranschaulicht. Man erhält sie durch Addition der zugehörigen Fluorometerwerte. Hier werden alle aus den Kurven erkannten Tatsachen noch besonders deutlich: *bch* unterscheidet sich von + vor allem bezüglich der Fleckengruppen I und III,

a (hellgelb) ist dagegen gerade in der Fleckengruppe II abgeändert. Kleine Unstetigkeiten im allmählichen Anstieg der Fluoreszenzintensität während der Augenentwicklung können von individuellen Schwankungen (z. B. in der Kopfgröße) herrühren. Eine Darstellung der fast gleichbleibend sehr tief liegenden Gesamtintensität der Fluoreszenzflecke von *wa* erübrigt sich.

III. Die Fluoreszenzintensität einzelner Stoffe auf zweidimensionalen Chromatogrammen

1. Zur chemischen Natur der fluoreszierenden Stoffe

Die Konstitutionsaufklärung der fluoreszierenden Stoffe führte bisher zur Kenntnis der Substanz g. Sie ist das im Tierreich weitverbreitete *Isoxanthopterin* (vgl. Kühn und Berg 1955, Kühn 1956, Hadorn und Egelhaaf 1956). Die zweite bekannte Substanz des Fluoreszenzmusters ist das *Riboflavin* (vgl. S. 676). Und zwar wird der chromatographische Befund noch durch einen besonderen chemischen Nachweis bestätigt. Dieser war unbedingt nötig, da in verschiedenen Tiergruppen ein Stoff aufgefunden wurde, der in fast allen gebräuchlichen Lösungsmitteln den gleichen R_f-Wert wie das Riboflavin besitzt und auch in der Fluoreszenzfarbe mit ihm übereinstimmt, so daß viele Autoren ihn als Riboflavin angesprochen hatten (z. B. Euler und Adler 1939, Hama 1953, Günder 1953 und 1954, bei niederen Vertebraten). Neuere Untersuchungen ergaben jedoch (Ziegler und Ziegler-Günder 1955), daß sich dieser Stoff zur Pteridoxamin-8-carbonsäure abbauen läßt. Das gleiche gilt für das gelbe Pigment von *Drosophila*[1], das ebenfalls chromatographisch kaum von Riboflavin zu unterscheiden ist und als Pteridoxamin-10-lactyl-8-carbonsäure erkannt wurde (Forrest und Mitchell 1954).

In der vorliegenden Arbeit wurde das Riboflavin durch *Überführung in Lumiflavin* nachgewiesen. Hierzu wurden die entsprechenden Flecke aus den Chromatogrammen von etwa 600 Köpfen junger *Ephestia*-Puppen ausgeschnitten und in n/10 NaOH eluiert. Nachdem die Lösung mehrtägiger starker Belichtung ausgesetzt worden war, konnte das entstandene Lumiflavin mit Chloroform ausgeschüttelt werden. Der chloroformlösliche Anteil wurde nochmals chromatographiert und ergab ausschließlich einen in Fluoreszenzfarbe und R_f-Wert mit Lumiflavin identischen Fleck, ebenso wie das zur Kontrolle parallel behandelte synthetische Riboflavin[2].

2. Fluorometrische Bestimmung von Isoxanthopterin und Riboflavin

Die Veränderungen des Riboflavingehaltes während der Imaginalaugenentwicklung sind wegen der in jedem Fall verschwindend kleinen Konzentration auf den Einkopfchromatogrammen nicht zu fassen. Auf Grund seiner Verbreitung in den Puppenköpfen aller Genotypen war es aber auch belangreich zu erfahren, ob die verschiedenen Augenfarbgene irgendeinen Einfluß auf seine Quantität ausüben. Zur Klärung dieser Frage mußten zweidimensionale Chromatogramme herangezogen werden.

Der zweite bei sämtlichen Stämmen wesentliche Fluoreszenzstoff ist das *Isoxanthopterin*. Um seine Konzentrationsänderungen im Entwicklungsverlauf

[1] *Anmerkung bei der Korrektur:* Nach neuester Mitteilung sind beide Stoffe identisch [Ziegler-Günder, J.: Z. Naturforsch. 11 b, 493 (1956)].

[2] Bezogen von der Fa. Merck, Darmstadt.

gesondert von den übrigen fluoreszierenden Stoffen betrachten zu können und um besser meßbare Konzentrationen der sehr kleinen Isoxanthopterinmenge von *wa*-Köpfen zu erhalten, war ich ebenfalls auf die zweidimensionalen Chromatogramme angewiesen.

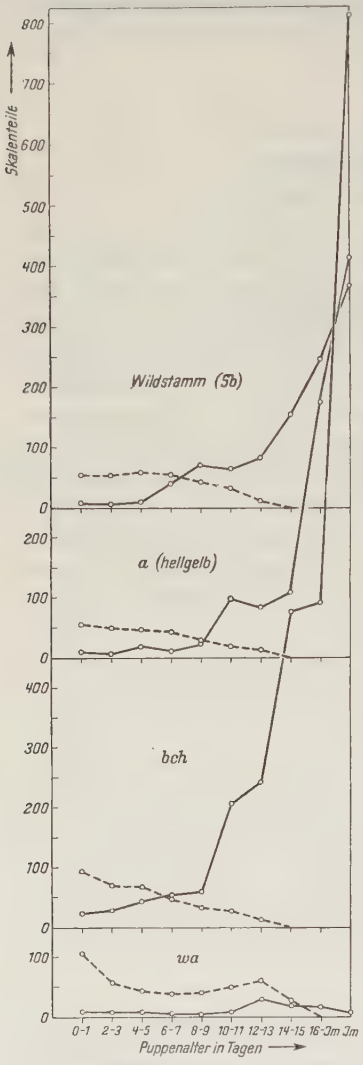


Abb. 11. Veränderungen der Riboflavinkonzentration (— — —) und der Isoxanthopterinkonzentration (———) in den Köpfen der 4 Augenfarbgenotypen während der Imaginalentwicklung

Für die Messungen wurden von allen Augenfarbrassen Serien zweidimensionaler Chromatogramme aus Methanolextrakten von je 20 Köpfen hergestellt. Und zwar wurden von der Verpuppung bis zum Schlüpfen der Imagines einschließlich jeweils 10 im Abstand von 2 Tagen aufeinanderfolgende Entwicklungsstadien verwendet. Die Tiere waren im Dunkelthermostat herangezogen worden, und auch die ganze Aufarbeitung und Auswertung erfolgte bei Dunkelheit bzw. Rotlicht. Nur zum Aufsuchen und Umranden der Fluoreszenzbereiche auf den Chromatogrammen wurden die Stoffe einer kurzdauernden Belichtung mit UV-Licht ausgesetzt. Zur Bestimmung der Fluoreszenzintensität der aus den Chromatogrammen herausgeschnittenen Flecke diente wieder das Fluorometer. Die Ergebnisse sind auf Abb. 11 dargestellt. Die Abszisse gibt das Alter der Puppen bzw. Imagines in Tagen an, die Ordinate die Galvanometerausschläge in Skalenteilen.

Die *Menge des Riboflavins* bleibt immer gering. Gleich nach der Verpuppung ist seine Konzentration am höchsten, erreicht aber auch hier, wie Eichmessungen mit synthetischem Riboflavin ergaben, noch nicht das Gewicht von 0,0025 γ je Kopf. Im Verlauf der Imaginalentwicklung erfolgt dann ein mehr oder weniger stetiges Absinken der Konzentration, bis bei 14—15 Tage alten Puppen überhaupt kein Riboflavin mehr nachgewiesen werden kann. Das eben gesagte trifft in auffälliger Gleichmäßigkeit für die Genotypen +, *a* und *bch* zu. Allein die Mutante *wa* weicht hiervon ab. Erstens weist sie anfänglich von allen Stämmen den höchsten Riboflavingehalt auf, und zweitens beginnt nach dem Absinken der Konzentration in den ersten Entwicklungstagen am 9. Tag ein Wiederanstieg. Am 13. Tag erscheint ein Konzentrationsmaximum, das allerdings nicht die Höhe des Ausgangspunktes erreicht. Darauf folgt dann der endgültge Kurvenabstieg. Und erst bei 16 Tage alten, also schlüpfreifen Puppen, 2 Tage später als bei den anderen Stämmen, bleibt der Riboflavinfleck auf den Chromatogrammen ganz aus.

Sehr eindrucksvoll sind die *Kurven des Isoxanthopterins*. Wie nach den vorangehenden Untersuchungen schon zu erwarten war, steigt der Isoxanthopteringehalt nach anfänglich sehr niedrigen Werten während der Puppenruhe beträchtlich an. Die Mutante *bch* zeigt von vornherein eine größere Konzentration; der

Kurvenanstieg ist im ganzen wesentlich steiler und erreicht bei den Imagines einen Isoxanthopteringehalt, der die Imaginalwerte der übrigen Stämme um ein Vielfaches übertrifft. Auch die Mutation *a* bewirkt gegenüber der Wildform eine größere Steilheit der Isoxanthopterinkurve. Die Fluoreszenzintensitäten des Isoxanthopterins aus den Imaginalköpfen von +, *a* (hellgelb) und *bch* verhalten sich etwa wie 6:11:25, was sehr gut mit den Ergebnissen von Hadorn und Kühn (1953), die auf einer anderen Methodik beruhen, übereinstimmt. Wiederum ganz abweichend ist das Verhalten der *Mutante wa. Das die Pigmentsynthese verhindernde Gen wirkt sich auch auf eine dauernde Geringhaltung der Isoxanthopterinkonzentration in den Augen aus.* Ein schwacher Kurvenanstieg führt zu einem Maximum am 13. Puppentag, das zeitlich gerade mit dem Riboflavinmaximum zusammenfällt. Der Abstieg erfolgt dann langsamer als beim Riboflavin, und auch die Imaginalköpfe enthalten noch eine geringe Isoxanthopterinmenge.

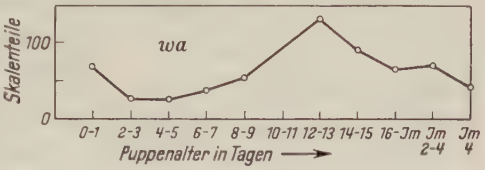


Abb. 12. Veränderungen der Isoxanthopterinkonzentration in den Köpfen der Mutante *wa* während der Imaginalentwicklung und des Imaginallebens

Eichungen mit synthetischem Isoxanthopterin[1] ermöglichen ungefähre absolute Mengenangaben. Hiernach läßt sich sagen, daß die Köpfe junger Puppen nur etwa je 0,001—0,002 γ Isoxanthopterin enthalten, lediglich bei *bch* dürften es 0,002—0,0025 γ sein. Das Maximum von *wa* erreicht ungefähr 0,003 γ, und die Imaginalwerte der 3 übrigen Stämme liegen in der Größenordnung von 0,05 γ (+), 0,1 γ (*a*) und 0,25 γ (*bch*) je Kopf. Die Fluoreszenzwerte des Riboflavins liegen ungefähr fünfmal so hoch wie die gleicher Mengen von Isoxanthopterin. Das rührt daher, daß das UV-Filter des Fluorometers gerade für gelbgrünes Licht maximal durchlässig ist.

In Abb. 12 ist noch eine zweite Isoxanthopterinmeßreihe von *wa* dargestellt, die mit einer abweichenden Arbeitsmethode gewonnen wurde (Propanol-Ammoniakextrakte) und den Kurvenverlauf der Abb. 11 bestätigt. Abb. 12 zeigt auch Meßwerte verschieden alter Imagines und läßt erkennen, daß der *Isoxanthopteringehalt mit zunehmendem Imaginalalter absinkt.* Ähnliche Befunde sind von den *Drosophila*-Mutanten *w* und *bw* bekannt (Hadorn 1954), die kein hellrotes und gelbes Pigment bilden. Hier wurde ein Abnehmen der Isoxanthopterinkonzentration aus der Gesamtkörpersubstanz der Imagines festgestellt, während — ebenfalls gemäß den *Ephestia*-Köpfen (Abb. 11) — die Konzentration bei der Wildform nach dem Schlüpfen noch ansteigt. Das Absinken bei den pigmentarmen *Drosophila*-Mutanten erfolgt aber bedeutend rascher als in den weißäugigen *Ephestia*-Köpfen. Schon nach 3 Tagen ist sämtliches Isoxanthopterin verschwunden, während bei 4 Tage alten *Ephestia*-Imagines immer noch ein beträchtlicher Isoxanthopteringehalt zu finden ist.

3. Besprechung der Riboflavin- und Isoxanthopterinkurven

Das allmähliche Abnehmen der Riboflavinkonzentration in den Köpfen der 3 Augenpigment führenden *Ephestia*-Rassen und die gleichzeitige Zunahme des Pterins (Abb. 11) erinnert an die Angaben von Burgess (1949) über die Eientwicklung der Feldheuschrecke *Melanoplus differentialis.* Sie ist ein Beispiel für

[1] Für die Überlassung des synthetischen Isoxanthopterins danke ich Herrn Professor Dr. Viscontini, Zürich.

die *Ablösung des Riboflavins durch Pterin* im Verlauf einer Entwicklungsphase. (Auch die umgekehrte Ablösungsfolge kann vorkommen, z. B. bei der Eientwicklung des Seidenspinners *Bombyx mori*, POLONOVSKI und BUSNEL 1950). Der von BURGESS und anderen Autoren für möglich gehaltene Umbau des Riboflavins zu Pterin könnte aber, falls er überhaupt bei *Ephestia*-Köpfen in Frage kommt, hier nur eine sehr geringe Rolle spielen, da die Ausgangskonzentration des Riboflavins nur einen winzigen Bruchteil der schließlich erreichten Pterinkonzentration ausmacht. Bei *wa* ist eine Ablösung des Riboflavins durch Isoxanthopterin überhaupt auszuschließen, da beide Kurven gleichsinnig verlaufen. Auffällig ist hier die flach U-förmige Kurvenform (die bei Vergrößerung des Ordinatenmaßstabes noch ausgeprägter wird) mit dem wieder absinkenden Endstück. Eine ganz ähnliche Gestalt hat die von TAYLOR (1927) aufgenommene *Atmungskurve* ganzer *Ephestia* Puppen. Er bestimmte den O_2-Verbrauch einzelner Tiere während der Puppenruhe, die bei höherer Zuchttemperatur nur rund 10 Tage betrug. Für den Vergleich der nach seinen Angaben gezeichneten Kurve des Sauerstoffverbrauches mit den Konzentrationskurven des Riboflavins und des Isoxanthopterins der *wa*-Köpfe wurde daher das Puppenalter in Prozenten der gesamten Puppenruhe angegeben (Abb. 13). Für die Atmungskurve wurden Mittelwerte aus den Messungen je einer männlichen und einer weiblichen Puppe verwendet. Den kleinen Kurvenabfall vor dem Schlüpfen fand TAYLOR bei allen von ihm untersuchten Lepidopteren und auch bei manchen Dipteren.

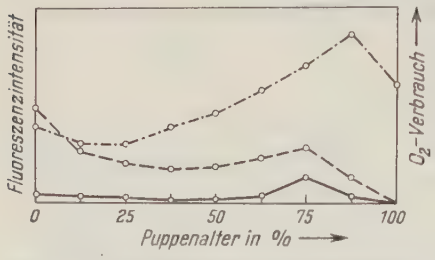


Abb. 13. Die Konzentration von Riboflavin (– – –) und Isoxanthopterin (———) in den Köpfen der Mutante *wa* während der Imaginalentwicklung im Vergleich zum O_2-Verbrauch ganzer *Ephestia*-Puppen (—·—·—). Altersangaben in Prozent der gesamten Puppenruhe

Es liegt nahe, in dem vorliegenden Riboflavin den Bestandteil eines gelben Atmungsfermentes zu vermuten, und auch das Eingreifen von Pterinen in den Atmungsstoffwechsel, und zwar analog dem Riboflavin, ist schon erwogen und gezeigt worden (z. B. BURGESS 1949, ZIEGLER und ZIEGLER-GÜNDER 1955). Ob auch speziell das Isoxanthopterin hier für die Atmung in Frage kommt, kann noch nicht entschieden werden. Das Fluoreszenzmuster der Augenpigment führenden *Ephestia*-Köpfe enthält wahrscheinlich auch noch andere Pterine[1], die vielleicht die Aufgabe des verschwindenden Riboflavins übernehmen könnten. Eine allgemeine Stoffwechselfunktion des Isoxanthopterins ist aber anzunehmen. Dafür spricht seine Verbreitung über den ganzen Mehlmottenkörper (HADORN und EGELHAAF 1956), sein Auftreten auch in den pigmentlosen Köpfen und sein Vorkommen vom Ei an (EGELHAAF 1956).

IV. Chromatographie isolierter Augen und Gehirne

Es war nun die Frage, ob das Schicksal der fluoreszierenden Stoffe in bestimmte zeitliche Beziehungen zur Histogenese der *Ephestia*-Köpfe gebracht werden kann. Zu ihrer Beantwortung mußte vor allem zunächst aufgeklärt

[1] *Anmerkung bei der Korrektur:* Inzwischen wurde bekannt, daß auch die Stoffe h, k_1 und k_2 und wahrscheinlich auch c Pterine sind [VISCONTINI, M., A. KUHN und A. EGELHAAF: Z. Naturforsch. 11 b, 501 (1956)].

werden, ob die von den ganzen Köpfen gewonnenen fluoreszierenden Substanzen tatsächlich aus den Augen stammen oder ob bei ihrer Bildung auch die Gehirne oder andere Teile des Kopfes mitwirken. Zu diesem Zweck isolierte ich aus Puppen aller Altersstufen Gehirne und Augen und chromatographierte sie getrennt neben ganzen Köpfen. Die fluorometrische Auswertung ergab einen verschwindend geringen Fluoreszenzstoffgehalt der Gehirne und fast gleiche Fluoreszenzintensitäten bei Augen und ganzen Köpfen. Abb. 14 zeigt die Meßergebnisse für Gehirne (schwarz) und für ganze Köpfe (weiß) zum Vergleich. Für die

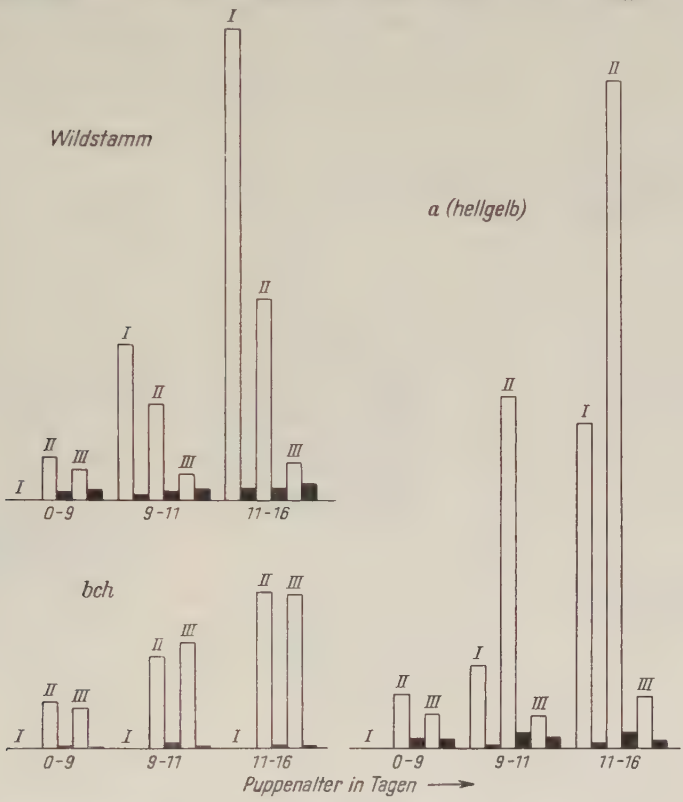


Abb. 14. Fluoreszenzintensität der Köpfe (weiß) im Vergleich mit der Fluoreszenzintensität der Gehirne (schwarz). *I—III*: Fleckengruppen

graphische Darstellung verwendete ich die Durchschnittswerte der Meßreihen von je 2 Gehirnen und je 5 ganzen Köpfen je Entwicklungstag. Die Fluoreszenzintensität der Gehirne ändert sich im Laufe der Entwicklung nur unbedeutend. Zwischen der Wildform und der helläugigen Mutante *a* ist kein wesentlicher Unterschied zu sehen. Die Gehirnfluoreszenz von *bch* bleibt jedoch gegenüber + und *a* auffallend schwach.

Untersuchungen an isolierten Augen und Gehirnen junger Puppenstadien von *wa* ließen erkennen, daß auch das Riboflavin aus den Augen stammt. Die Gehirne der *wa*-Mutante ergaben, obwohl ich 20 für ein Chromatogramm verwendete, keine erfaßbare Fluoreszenz.

Folglich *kommt in jedem Fall die Hauptmenge der fluoreszierenden Substanzen aus den Augen*, und daher konnten sich die histologischen Untersuchungen auf die Augen beschränken.

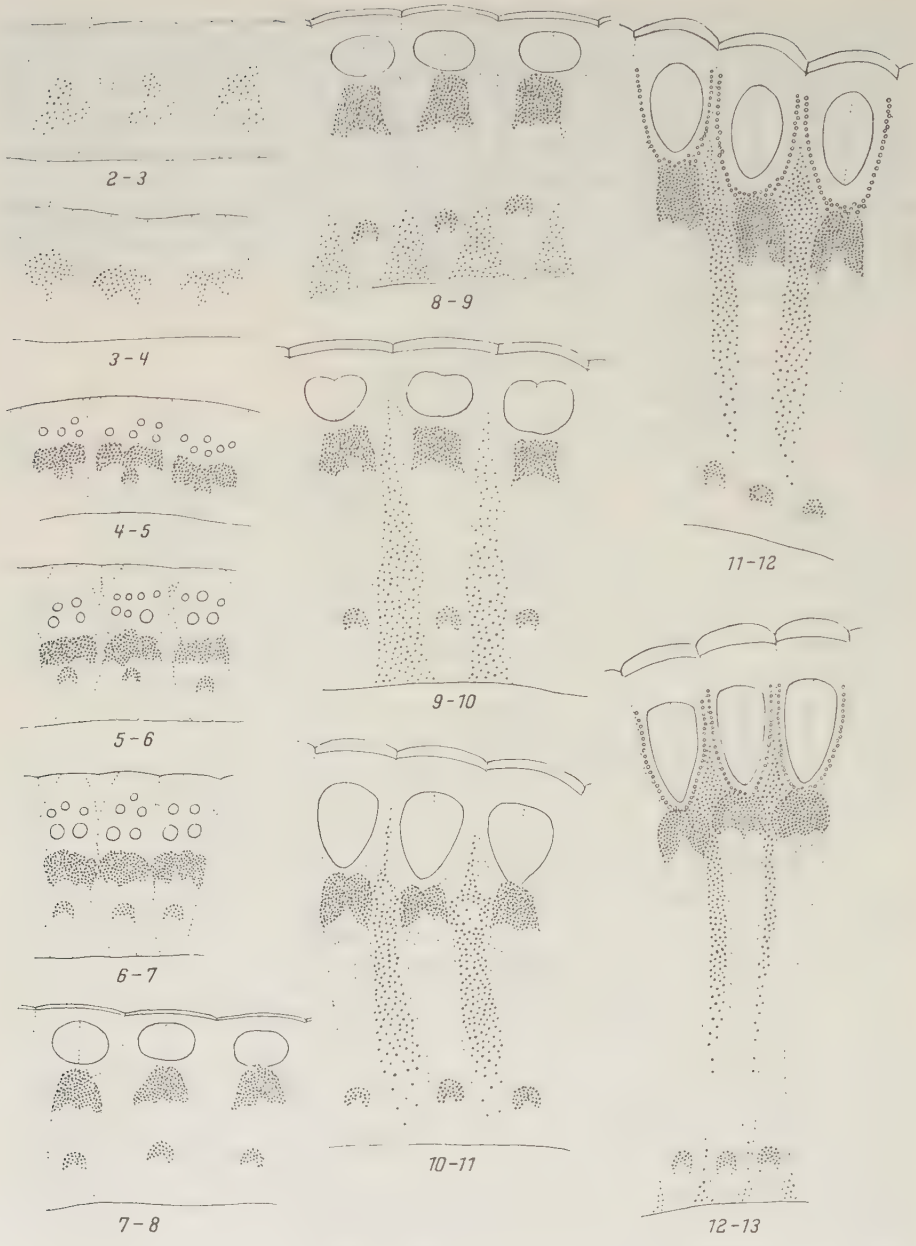


Abb. 15. Ommatidienlängsschnitte von Puppen des Wildstammes. Ungefärbte

V. Histologische Untersuchung der Augenentwicklung

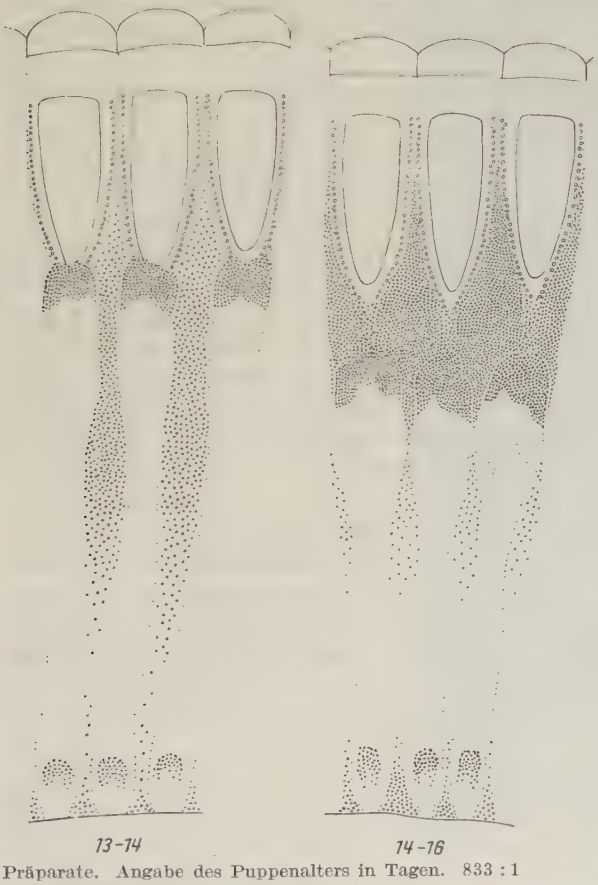
1. Allgemein, mit Berücksichtigung der Ergebnisse früherer Autoren

Die Entwicklung und den Bau des wildfarbigen Komplexauges von *Ephestia* untersuchte UMBACH (1934). PLAGGE (1935) beschrieb die Pigmentierung der Imaginal- und Raupenaugen bei verschiedenen *Ephestia*-Rassen und HANSER (1948) die Histogenese der Augenpigmentgranula bei *Ephestia* a^+ und a. Eigene

Untersuchungen ergaben hinsichtlich der Altersangaben für bestimmte Entwicklungsvorgänge kleine Differenzen zu den oben angeführten Arbeiten.

Die Entwicklungsgeschwindigkeit von *Ephestia* ist in den Institutszuchten heute durchweg größer als früher. Das kann außer auf der jetzt etwas höheren Zuchttemperatur (bei Hanser 20° C und hier 19,5° C gegenüber 18° C bei Umbach und Plagge) auch noch darauf beruhen, daß immer die erstgeschlüpften Imagines zur Weiterzucht verwendet und dadurch Selektionswirkungen erzielt wurden.

a) Der Zellenverband. Das Komplexauge von *Ephestia* besteht aus sehr zahlreichen Ommatidien, die sich ihrerseits wieder aus mehreren, verschieden gestalteten Zellen zusammensetzen. Es entwickelt sich aus der Augenimaginalscheibe, die im letzten Larvenstadium als Epidermisfalte vor den bogenförmig angeordneten Raupenaugen liegt. Zu Beginn der Herausbildung regelmäßiger Zellengruppen erstrecken sich sämtliche Zellen über die ganze Höhe der Augenepidermis. Alle bis zum 10. Tag einsetzenden Differenzierungen verlaufen zuerst im dorsocaudalen Bezirk der Augenimaginalscheibe. Von dann ab, wenn die Neubildung der Ommatidien am Rand der Augenanlage aufgehört hat, erfolgt die weitere Entwicklung überall gleichzeitig. Die Zeitangaben für bestimmte Entwicklungsvorgänge (Abb. 15) beziehen sich auf die dorsocaudalen Ommatidien.



Präparate. Angabe des Puppenalters in Tagen. 833 : 1

Etwa am 5. Tag werden die ersten Differenzierungen innerhalb der Zellengruppen beobachtet. Es können distale von proximalen Zellen unterschieden werden. Im Komplex der Kristallkegelbildungszellen beginnt die Abscheidung von Sekrettröpfchen. Etwa am 7. Tag fangen die Tröpfchen an zusammenzufließen, und am 8. Tag fügen sich die großen Sekretvakuolen der zu einem Ommatidium gehörenden vier Kristallkegelbildungszellen so dicht aneinander, daß man schließlich ein einheitliches Gebilde zu sehen meint. Es besteht aber auch in späteren Stadien stets noch aus vier Segmenten. Zunächst zeigt es auf dem Ommatidienlängsschnitt die Form einer horizontalen Ellipse. Vom 10. Tage an nimmt sein Volumen bedeutend zu, und vom 11. bis zum 15. Tag vollzieht sich die Längsstreckung zur endgültigen Kristallkegelform. Seitlich schließen sich an die Kristallkegelzellen die Corneazellen (= Hauptpigmentzellen) an. Im Verlauf der Entwicklung verlagern sie ihre Hauptplasmamasse unter die Kristallkegelzellen, und im fertig ausgebildeten Auge stellen sie nur

noch eine ganz dünne Hülle um den Kristallkegel dar, die sog. Kristallkegelscheide. Etwa am 8. Tag beginnen die Corneapigmentzellen, die chitinige Cornea abzuscheiden, die bis zur Schlüpfreife der Puppen stetig an Dicke zunimmt. Der proximale Komplex der Retinulazellen besteht normalerweise aus 10 Zellen. Beim Streckungswachstum der Ommatidien bleibt die zentrale Retinulazelle (= Basalzelle) gegenüber den peripheren Retinulazellen zurück. Letztere scheiden, wie UMBACH zeigte, oberhalb der Basalzelle zentralwärts einen kutikulären Axialstrang ab. Am 14. Tag etwa verdickt sich der proximale Teil des Axialstranges zum Rhabdom, der größere distale Teil bildet sich zum dünnen Achsenfaden um. Den Raum zwischen den Ommatidien füllen die Nebenpigmentzellen aus, je eine ist von drei Ommatidien umgeben. Sie können an manchen Stellen durch die übrigen Ommatidienelemente bis auf eine dünne Plasmaschicht zusammengedrängt sein. Etwa am 8. Tag beginnt nach UMBACH das Einwachsen von Tracheen in den Raum zwischen den beiden Basalmembranen. Im fertig ausgebildeten Auge liegen dicht unter der Basalmembran zahlreiche gelappte Großkerne, in deren Buchten die Tracheen verlaufen und sich zu Tracheolen aufzweigen. Von jedem Tracheengroßkern gehen mehrere Tracheolen aus, die gemeinsam mit Nervenfasern durch die sekundäre Basalmembran hindurchtreten und die Ommatidien bis zur Höhe der distalen Rhabdomenden umgeben.

b) Das Pigment. Auftreten und Ausbildung des Pigments unterscheiden sich bei den verschiedenen Augenfarbrassen.

Wildstamm. Die ungefärbten Präparate der Abb. 15 erlauben eine genaue Beobachtung des Pigments. Dieses erscheint zuerst bei 2—3 Tage alten Puppen im Zentrum von Zellengruppen, die sich soeben aus dem epidermalen Zellenverband herausdifferenziert hatten. In den 4—5 Tage alten Augen erkennt man die Zugehörigkeit dieses ersten Pigments zu den Retinulazellen. Die Menge und Korngröße des Retinulazellpigments nimmt bis etwa zum 10. Tag ständig zu, und damit geht eine Farbvertiefung einher (HANSER 1948). Das Zurückbleiben der basalen Retinulazelle erkennt man an dem nicht mit hinauf verschobenen Pigmenthäufchen, das eine distale Kappe über dem Kern bildet. Am 9. Tag erscheint das erste Pigment in den Nebenpigmentzellen, und zwar in der Nähe der Kerne nahe der Basalmembran. HANSER konnte schon ungefähr 20 Std vor dem Auftreten des braunen Pigments kleine, mit Hämatoxylin färbbare Granula nachweisen. Bei dem jetzt einsetzenden starken Längenwachstum der Ommatidien rücken die Kerne der Nebenpigmentzellen distalwärts in die Kristallkegelregion, und damit geht eine gleichsinnige Verlagerung des stetig an Menge zunehmenden Pigments einher. Am 12. Tag erscheint in der Umgebung der Kristallkegel das dunkelgelbe Corneazellpigment, das mengenmäßig immer beträchtlich hinter dem Pigment der Retinula- und Nebenpigmentzellen zurückbleibt. Etwa am 14. Tag tritt proximal der Basalmembran das erste Pigment in den Gliazellen der Nervenbündelschicht auf.

Mutante a. Bei der Mutante *a* vollzieht sich die Pigmentbildung in der Augenanlage in der gleichen Reihenfolge wie bei der Wildform (PLAGGE 1935). Doch ist die Entwicklung nach HANSER in folgender Weise abgeändert. Erst bei 9—10 Tage alten Puppen treten vereinzelte Pigmentgranula in den Retinulazellen auf. Im Alter von 10—11 Tagen ist das Retinulazellpigment dann schon deutlich in den distalen Zellteilen und über dem Kern der Basalzellen zu sehen. Erst am 15. Tag erscheint Pigment in den Neben- und Corneapigmentzellen. Die Pigmentkörner der helläugigen Mutante sind viel kleiner als die der Wildform.

Mutante bch. Bei der Augenentwicklung der Mutante *biochemica* ist das Ausbleiben der Pigmentbildung in den Corneazellen von Bedeutung. Es sind nur sehr kleine, lichtbrechende Granula in diesen Zellen zu beobachten, die, wie

Kühn und Berg (1955) zeigten, nach Extraktion mit Wasser als winzige, ungefärbt nur noch im Phasenkontrastmikroskop sichtbare Körnchen zurückbleiben. Der sich im Wasser offenbar lösende Bestandteil der Granulen läßt aber keine Farbe erkennen. Auch das Pigment der Neben- und Retinulazellen weicht vom Wildtyp ab, wie Kühn und Berg schon mitteilten. Und zwar wird das Dunkelbraun des wildfarbigen Pigments durch die Mutation in tiefes Schwarz abgeändert. Je nach der Behandlung der Augenschnitte bzw. der ganzen Augen können beide Farbtöne auch heller erscheinen, die Differenz bleibt jedoch bestehen.

Mutante wa. Die histologische Entwicklung der *wa*-Augen wurde wiederum bereits von Hanser (1948) untersucht. Den weißen Augen fehlt das Pigment vollständig. Durch das Gen *wa* bedingt, unterbleibt die Entstehung der Eiweißgranulen, die als Trägersubstanz für die Augenpigmentbildung erforderlich sind. Darauf beruht es, daß sich die Endsynthese des Pigments trotz der Bildung der Vorstufen nicht vollziehen kann.

2. *Fluoreszenzmikroskopische Untersuchung*

Da die Vorbehandlung der Schnittpräparate (S. 670) ganz wasserfrei ausgeführt wurde, konnte man hoffen, daß die fluoreszierenden Stoffe noch im Gewebe erhalten geblieben waren. Um sicherzugehen, löste ich 5 eingebettete Köpfe schlüpfreifer Puppen wieder aus den Paraffin-Celloidinblöckchen heraus. Ich führte sie durch die Reihe der Einbettungsflüssigkeiten rückschreitend hindurch und brachte sie aus dem absoluten Alkohol heraus direkt auf Chromatographiepapier. Dort zerdrückte ich sie einzeln auf der Startlinie und gab hierbei noch je einen Tropfen destilliertes Wasser hinzu, damit die durch Alkoholverdunstung sehr rasch trocknenden Gewebe besser am Papier hafteten. Zum Vergleich wurden auf demselben Blatt 5 Köpfe gleichaltriger frischer Tiere entwickelt. Es ergab sich völlige Übereinstimmung der fluorometrischen Meßkurven von eingebettet gewesenen und frischen Köpfen im Bereich der stets vorhandenen individuellen Schwankungsbreite. Hieraus folgt, daß auch im Schnittpräparat noch der ganze Bestand an fluoreszierenden Substanzen zugegen sein muß.

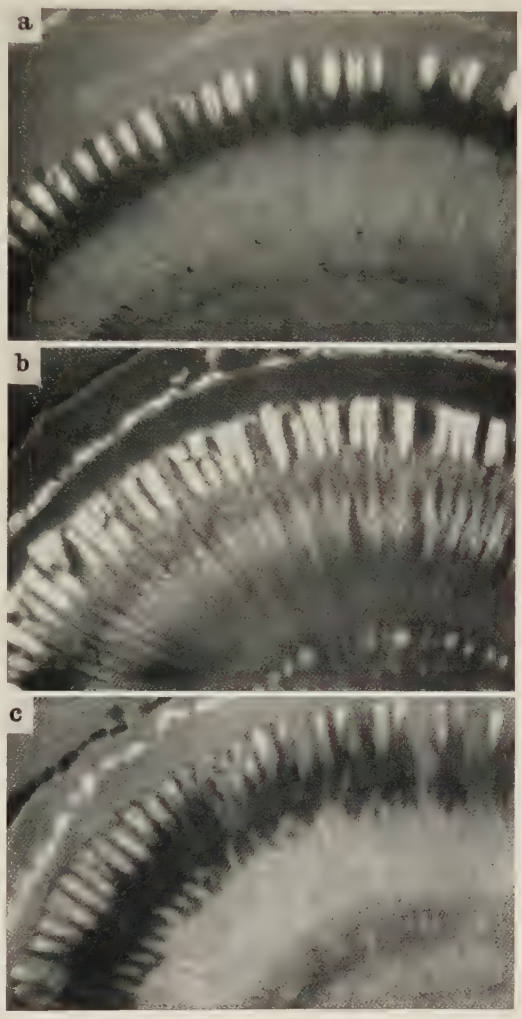


Abb. 16 a—c. Fluoreszenzmikroskopische Photographien von Augenlängsschnitten schlüpfreifer Puppen. a Wildstamm; b Mutante *a*; c Mutante *bch*

Schnitte durch vollentwickelte +-Augen ließen im Fluoreszenzmikroskop Primärfluoreszenz erkennen: kräftig hellblau-grünliche Fluoreszenz in den *Kristallkegeln* (die bei langer Aufbewahrung allmählich in gelb übergeht), etwas schwächere in der Cornea und ganz schwache über das gesamte Gewebe des Kopfes verbreitet (Abb. 16a). Nun wurden auch Schnitte gleichaltriger *a*- und *bch*-Köpfe zum Vergleich herangezogen. Das Ergebnis zeigte überraschend deutlich die erbbedingten Differenzen an. Bei *a* ist die Kristallkegelfluoreszenz noch wesentlich stärker als beim Wildstamm und rein hellblau (bei lange aufbewahrten Schnitten erfolgt ein Übergang zu mehr gelbgrünen Farbtönen), ebenso fluoreszieren die Retinulazellkerne und die Kerne der Basalzellen intensiver. Dazu kommt noch eine kräftighelle Fluoreszenz an den Orten der Tracheengroßkerne proximal der Basalmembran. Die Corneafluoreszenz erscheint ebenfalls etwas stärker, und auch im Bereich aller Pigmente ist eine deutliche Aufhellung wahrzunehmen (Abb. 16b). Bei *bch* zeigen die Schnitte nur geringste Fluoreszenz. Die Kristallkegel geben einen schwachen, grünlichen Schimmer. Auch die Cornea fluoresziert nur minimal, und alle übrigen Gewebeelemente erscheinen fast dunkel (Abb. 16c). Frische Schnitte durch die weißen *wa*-Augen lassen eine über das ganze Gewebe verbreitete schwache, weißliche Fluoreszenz erkennen, die bei älteren Präparaten nur in den Kristallkegeln erhalten bleibt.

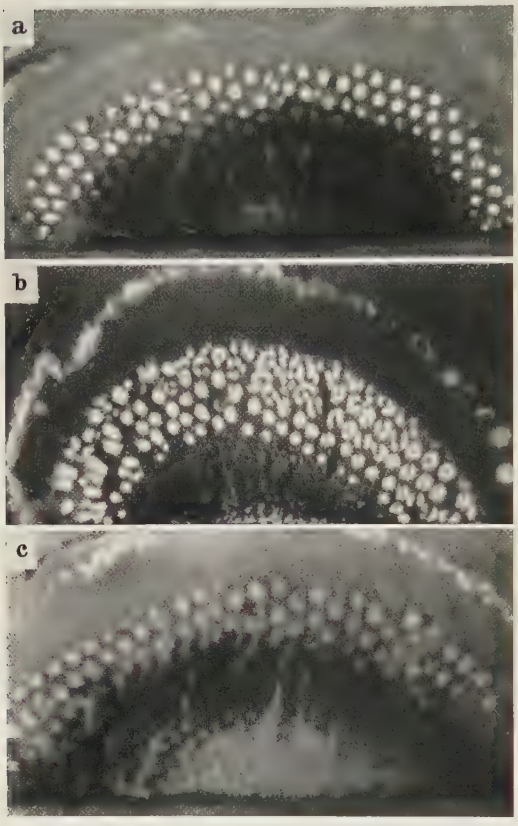


Abb. 17 a—c. Fluoreszenzmikroskopische Photographien von Querschnitten durch Augen schlüpfreifer Puppen. a Wildstamm; b Mutante *a*; c Mutante *bch*

Daß die hauptsächlichste Fluoreszenz mit Gewißheit aus den Kristallkegeln kommt und nicht etwa aus den Kristallkegelscheiden, beweisen die Ommatidienquerschnitte in Abb. 17a—c. Und daß diese Fluoreszenz tatsächlich von löslichen Stoffen hervorgebracht wird, erkennt man bei fluoreszenzmikroskopischer Betrachtung eines uneingedeckten Schnittpräparates von +- oder *a*-Augen, dem man 1 Tropfen Ammoniakwasser zusetzt. Aus den betroffenen Kristallkegeln diffundiert eine stark hellblau fluoreszierende Wolke heraus, und schließlich sind von den Kristallkegeln nur noch blasse Umrisse sichtbar. Die weißliche Fluoreszenz der *wa*-Kristallkegel verschwindet ebenfalls bei Behandlung mit Ammoniakwasser, aber es ist dabei keinerlei Aufhellung in den Nachbarbereichen zu beobachten.

Die Augenpräparate junger Puppen zeigen schon in den Sekretvakuolen, die den Kristallkegeln in der Entwicklung vorangehen, schwache Fluoreszenz. Die Intensität ist zunächst sehr gering und wächst stetig mit der Weiterentwicklung der Kristallkegel.

VI. Vergleichende Betrachtung der Chromatogramme und der histologischen Präparate

Kausale Zusammenhänge zwischen der Formbildung der Ommatidien, der Pigmentbildung und dem Vorkommen fluoreszierender Stoffe sind nicht ersichtlich. Die meisten fluoreszierenden Substanzen erscheinen auf den Chromatogrammen schon in sehr frühen Entwicklungsstadien, wenn erst die Retinulazellen etwas Pigment enthalten. (Bei + die Stoffe b, f_2, g, h, m und Ri, bei *a* f_2, g, h, k und Ri und bei *bch* b, f_2, g, k, m, x und Ri.) Von den später hinzukommenden Fluoreszenzstoffen weisen höchstens die blauen k-Substanzen in ihrer Entstehung eine zeitliche Beziehung zum Auftreten von Pigmenten auf (zum Auftreten des Nebenzellen- und des Corneazellenpigments), aber dies trifft auch nicht bei allen Genotypen zu. Die Mutante *wa* bildet ihr — zwar stark reduziertes — Fluoreszenzmuster ohnehin unabhängig von Pigmenten aus.

Offenbar bestehen dagegen Zusammenhänge zwischen einigen fluoreszierenden Stoffen und der Kristallkegelsubstanz, in der sie anscheinend — ganz oder teilweise — enthalten sind. Auf den Chromatogrammen von + und *bch* erscheint zu Beginn des stärksten Kristallkegelwachstums der Fleck l. Bei + und noch mehr bei *a* ist eine Intensitätssteigerung der eisblauen Flecke (c, e, f_1) parallel zur Größenzunahme der sich entwickelnden Kristallkegel zu erkennen. Entsprechend zeigen auch die fluoreszenzmikroskopischen Bilder fertig ausgebildeter Augen bei den verschiedenen Genotypen Übereinstimmung der Kristallkegelfarben mit den chromatographisch erfaßten Fluoreszenzmustern: Die Intensität der eisblau fluoreszierenden Flecke ist bei der *a*-Mutante gegenüber der Wildform stark erhöht, während die Stoffe mit grüner Fluoreszenz, f_2 und l, die sowohl bei + als auch bei dem *bch*-Stamm vorkommen, in vollentwickelten *a*-Augen fehlen. Das kann der Grund dafür sein, daß die Kristallkegel des helläugigen Stammes so besonders kräftig und rein hellblau fluoreszieren. Auf den Chromatogrammen von *bch* fehlt dagegen jegliche eisblaue Fluoreszenz, und es kommt überhaupt nur dunkler blaue (g, k) und grüne (f_2, l) vor. Es läßt sich vermuten, daß Stoff f_2 oder Stoff l oder beide die schwache, grüne Fluoreszenz der *bch*-Kristallkegel bedingen. Die Wildform, die sowohl über die eisblauen als auch über die grün fluoreszierenden Stoffe verfügt, müßte demnach eine Mischung von eisblauer und grüner Fluoreszenz in den Kristallkegeln aufweisen, was auch tatsächlich zutrifft. Die Verarmung des Fluoreszenzmusters durch die Mutation *wa* läßt nun erwarten, daß auch die Kristallkegel keine Fluoreszenzfarben zeigen. Diese Vermutung hat sich bestätigt; aber es ist eine blasse, weißliche Fluoreszenz zu beobachten, die zwar unter der Einwirkung von Ammoniakwasser verschwindet, jedoch chromatographisch nicht zu fassen ist.

Die vollkommene Aufklärung der chemischen Natur, der histologischen Lokalisation und der physiologischen Bedeutung der fluoreszierenden Substanzen muß eingehenden biochemischen Untersuchungen vorbehalten bleiben. Wenn sie gelungen ist, dann wird an Hand der vorliegenden Ergebnisse ein neuer Einblick in das Eingreifen der Augenfarbgene in den Entwicklungsablauf möglich sein.

Zusammenfassung

Der Bestand an fluoreszierenden Stoffen in Puppen- und Imaginalköpfen mehrerer Augenfarbrassen von *Ephestia kühniella* (Wildstamm, *a* [hellgelb], *bch* und *wa*) wird papierchromatographisch (mittels zweidimensionaler Chromatogramme) festgestellt. Die Augenpigment führenden Genotypen besitzen einen wesentlich höheren Fluoreszenzstoffgehalt als die weißäugige Mutante.

Das Fluoreszenzmuster in den Köpfen ganz junger Puppen besteht nur aus wenigen deutlichen Flecken. Während der Entwicklung erleidet es mannigfache Veränderungen, die bei jeder Augenfarbrasse ihren eigenen Verlauf nehmen. Im allgemeinen wächst die Anzahl der Flecke und ihre Intensität nimmt zu, doch gibt es auch Fälle, in denen fluoreszierende Stoffe allmählich wieder verschwinden.

Fluorometrische Bestimmungen der Fluoreszenz eindimensionaler Chromatogramme von Einzelköpfen führen zu Kurven, die für jedes Entwicklungsstadium und für jede Augenfarbrasse einen charakteristischen Verlauf zeigen.

Die Fluoreszenzintensität zweier bei allen Genotypen vorkommender Stoffe wird auf zweidimensionalen Chromatogrammen besonders untersucht. Es wird gezeigt, daß es sich bei dem einen Stoff um Riboflavin handelt, der andere ist schon als Isoxanthopterin bekannt. Die sich ergebenden Kurven verlaufen — abgesehen von Quantitätsunterschieden — bei den Stämmen mit Augenpigment gleichsinnig, indem während der Entwicklung der Riboflavingehalt ab- und der Isoxanthopteringehalt zunimmt. Die Kurven des weißäugigen Stammes sind abweichend gestaltet und ähneln der Kurve des O_2-Verbrauchs ganzer Puppen während ihrer Entwicklung.

Die Hauptmenge der fluoreszierenden Stoffe stammt aus den Augen, die Gehirne enthalten nur einen ganz geringen Anteil.

Die Histogenese der *Ephestia*-Augen, insbesondere das Auftreten und die Ausbildung des Pigments werden an Hand der Ergebnisse früherer Autoren und eigener Untersuchungen geschildert.

Beziehungen zwischen den Veränderungen des Fluoreszenzmusters und der Bildung der Pigmente sind zunächst nicht feststellbar.

Es werden Zusammenhänge zwischen dem Fluoreszenzmuster und den Kristallkegeln gezeigt. Die Kristallkegel der verschiedenen Augenfarbgenotypen enthalten — je nach ihrem Fluoreszenzmuster in quantitativ und qualitativ unterschiedlicher Zusammensetzung — einen Teil der fluoreszierenden Stoffe. Die betreffenden Stoffe erscheinen im Entwicklungsverlauf von dem Zeitpunkt an, in dem die Ausbildung der Kristallkegel beginnt.

Literatur

BODINE, J. H., and L. R. FITZGERALD: Riboflavin and other fluorescent compounds in a developing egg (Orthoptera). Physiologic. Zool. **20**, 146 (1947). — BURGESS, L.: A preliminary quantitative study of pterine pigment in the developing egg of the grasshopper *Melanoplus differentialis*. Arch. of Biochem. **20**, 347 (1949). — BUSNEL, R. G., et A. DRILHON: Recherches sur la répartition de la riboflavine (vitamine B_2) et de quelques autres substances fluorescentes chez les insectes. Arch. Zool. expér. **82**, 321 (1942). — EGELHAAF, A.: Quantitativer Vergleich der Fluoreszenzmuster der Eier dreier Genotypen von *Ephestia kühniella*. Naturwiss. **43**, 165 (1956). — EULER, H., u. A. ADLER: Über Flavin und einen blau fluoreszierenden Stoff in der Netzhaut der Fischaugen. Z. physiol. Chem. **228**, 1 (1939). — FORREST, H. S., and H. K. MITCHELL: The pteridines of *Drosophila melanogaster*. Ciba Foundation on Chemistry

and Biology of Pteridines. London 1954. — Günder, I.: Nachweis und Lokalisation von Pterinen und Riboflavin in der Haut von Amphibien und Reptilien. Z. vergl. Physiol. **36**, 78 (1954). — Quantitative Untersuchung über die Entwicklung der Pterine und des Riboflavins in der Haut und im Auge von *Bufo bufo*. Z. Naturforsch. **10b**, 173 (1955). — Hadorn, E.: Ontogenetische Änderungen im Gehalt an Isoxanthopterin bei verschiedenen Genotypen von *Drosophila melanogaster*. Experientia (Basel) **10**, 12, 483 (1954). — Hadorn, E., u. A. Egelhaaf: Biochemische Polyphänie und Stoffverteilung im Körper verschiedener Augenfarbgenotypen von *Ephestia kühniella*. Z. Naturforsch. **11b**, 21 (1956). — Hadorn, E., u. A. Kühn: Chromatographische und fluorometrische Untersuchungen zur biochemischen Polyphänie von Augenfarbgenen bei *Ephestia kühniella*. Z. Naturforsch. **8b**, 582 (1953). Hadorn, E., and H. K. Mitchell: Properties of mutants of *Drosophila melanogaster* and changes during development as revealed by paper chromatography. Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. **37** (1951). — Hama, T.: Substances fluorescentes du type ptérinique dans la peau ou les yeux de la grenouille *(Rana nigromaculata)* et leur transformations photochimiques. Experientia (Basel) **9**, 29 (1953). — Hanser, G.: Über die Histogenese der Augenpigmentgranula bei verschiedenen Rassen von *Ephestia kühniella* Z. und *Ptychopoda seriata* Schrk. Z. Vererbungslehre **82**, 74 (1948). — Kühn, A.: Über eine Genwirkkette der Pigmentbildung bei Insekten. Nachr. Ges. Wiss. Göttingen, Math.-physik. Kl. 1941. Zur Genetik der helläugigen Mehlmottenstämme. Z. Vererbungslehre **82**, 136 (1948). – Ein Fluorometer für Papierchromatogramme. Naturwiss. **42**, 529 (1955). — Versuche zur Entwicklung eines Modells der Genwirkungen. Naturwiss. **43**, 25 (1956). — Kühn, A., u. B. Berg: Zur genetischen Analyse der Mutation *biochemica* von *Ephestia kühniella*. Z. Vererbungslehre **87**, 25 (1955). — Kühn, A., u. V. Schwartz: Über eine weißäugige Mutante (wa) von *Ephestia kühniella*. Biol. Zbl. **62**, 226 (1942). — Plagge, E.: Die Pigmentierung der Imaginal- und Raupenaugen der Mehlmotte *Ephestia kühniella* Z. bei verschiedenen Rassen, Transplantatträgern und Rassenkreuzungen. Roux' Arch. **132**, 648 (1935). — Polonovski, M., et R. G. Busnel: Sur les pigmentes ptériniques de l'aile et de l'oeuf de *Bombyx mori*. C. r. Acad. Sci. Paris **230**, 585 (1950). — Taylor, I. R.: Oxygen consumption of individual pupae during metamorphosis. J. of Morph. **44**, 313 (1927). — Umbach, W.: Entwicklung und Bau des Komplexauges der Mehlmotte *Ephestia kühniella* Z. nebst einigen Bemerkungen über die Entwicklung der optischen Ganglien. Z. Morph. u. Ökol. Tiere **28**, 561 (1934). — Ziegler, H., u. I. Ziegler-Günder: Über die Photolabilität der Amphibienpterine und die Wirkung dieser Stoffe auf die Sauerstoffaufnahme der Gewebe. Z. Naturforsch. **10b**, 642 (1955).

Eveline Reisener-Glasewald, Tübingen, Max-Planck-Institut für Biologie, Abteilung Kühn, Spemannstraße 34

Zeitschrift für indukt. Abstammungs- und Vererbungslehre, Bd. 87, S. 694 - 707 (1956)

Aus dem Max-Planck-Institut für vergleichende Erbbiologie und Erbpathologie (Abteilung Lüers), Berlin-Dahlem (Direktor: Prof. Dr. Dr. h. c. H. Nachtsheim)

ENTWICKLUNGSPHYSIOLOGISCHE UND BIOMETRISCHE UNTERSUCHUNGEN AN DDT-SENSIBLEN UND RESISTENTEN STÄMMEN VON *DROSOPHILA MELANOGASTER*

Von

Veronika Bochnig

Mit 1 Textabbildung

(Eingegangen am 16. Mai 1956)

Inhalt

Seite

A. Einleitung 694
B. Material und Methoden 696
C. Versuchsergebnisse 697
1. Entwicklungsphysiologische Eigenschaften 697
a) Dauer der larvalen Entwicklung 697
b) Imaginale Schlüpfraten, bezogen auf die Eizahl 697
c) Tägliche Schlüpfraten der Imagines 698
d) Anzahl der Nachkommen 699
e) Lebendgewicht der Imagines 700
2. Morphologische Eigenschaften 701
D. Diskussion 704
Zusammenfassung 706
Literatur 706

A. Einleitung

In unseren Untersuchungen über die Entwicklung und Vererbung der DDT-Resistenz bei *Drosophila melanogaster* (Bochnig 1954) gewannen wir den Eindruck, daß die Entwicklungsgeschwindigkeit bei den resistenten Stämmen leicht verzögert war und die Imagines gegenüber denen aus den sensiblen Stämmen etwas vergrößert erschienen. Diese Beobachtung führte uns zu der Frage, ob sich zusammen mit der Resistenz im Laufe der Generationen andere physiologische und morphologische Merkmale herausgebildet haben, die mit der Resistenz in einem Zusammenhang stehen.

In der Literatur finden sich bereits Angaben über vergleichende Untersuchungen von empfindlichen und Insektizid-resistenten Formen bezüglich solcher Eigenschaften. In der Hauptsache wurden bisher Stubenfliegen herangezogen. Unseres Erachtens haftet aber fast allen diesen Arbeiten ein Mangel an, der die unterschiedlichen und widersprechenden Ergebnisse, die darin zutage traten, verstehen läßt. Es wurden nämlich in der Mehrzahl der Fälle sensible und resistente Stämme miteinander verglichen, die von verschiedener Provenienz waren und daher von vornherein genetisch bedingte Differenzen physiologischer oder morphologischer Art erwarten ließen. Andererseits könnten bei einem Vergleich nichtverwandter Stämme durch Selektion entwickelte Unterschiede verschleiert werden, da es sich bei solchen Merkmalen zumeist um polygen bedingte quantitative Eigenschaften handelt, die in Stämmen unterschiedlicher Herkunft mehr oder weniger stark variieren.

Pimentel, Dewey und Schwardt (1951) untersuchten 4 DDT-resistente und einen empfindlichen Stubenfliegenstamm und fanden bei allen resistenten Stämmen eine verlängerte Larvenperiode. Dabei scheint die Länge der Larvenperiode dem Empfindlichkeitsgrad der Fliegen zu entsprechen. Es zeigte sich ferner, daß innerhalb der resistenten Stämme Fliegen aus Larven, die sich während der ersten 48 Std der Verpuppungsperiode verpuppt hatten, einen geringeren Resistenzgrad aufwiesen als Fliegen, deren Larven sich erst später verpuppt hatten. In der Zahl der abgelegten Eier, im Prozentsatz der geschlüpften Eier, in der Länge des Puppenstadiums, im Puppengewicht, im Geschlechtsverhältnis, in der Länge der Präovipositionsperiode und des adulten Stadiums fanden sich zwischen einem hochresistenten und einem empfindlichen Stamm keine signifikanten Differenzen. Auch Bruce (1949, zit. nach Babers, Pratt und Williams 1953) fand bei resistenten Stubenfliegen eine längere Entwicklungsdauer vom Ei bis zur Imago. Wiesmann (1947) verglich einen DDT-resistenten *Musca*-Stamm aus Arnäs-Schweden mit einem empfindlichen Baseler Stamm. Der schwedische Stamm zeichnete sich durch eine dunklere Pigmentierung, eine dickere Kutikula auf den Endgliedern der Tarsen und durch stärkere Borsten aus. Dagegen konnten Babers, Pratt und Williams (1953) bei 6 empfindlichen und 2 resistenten *Musca*-Stämmen keine nur der einen Gruppe zukommenden Besonderheiten im Prozentsatz der geschlüpften Eier, in der Dauer der Larvenperiode und in der Zahl der aus 500 Eiern sich entwickelnden Imagines ermitteln. Der Vergleich eines DDT-resistenten und eines sensiblen Stubenfliegenstammes durch March und Lewallen (1950) ergab ebenfalls keine Differenzen in der Länge des Entwicklungszyklus, im Gewicht der weiblichen Fliegen, in der Empfindlichkeit gegen Hitze und Kälte, in der Länge und Breite der Tarsalsegmente und der Dicke der tarsalen und thorakalen Kutikula. Varzendeh, Bruce und Decker (1954) untersuchten mehrere resistente und empfindliche Stubenfliegenstämme in bezug auf ihr Lebenspotential. Als Indikator benutzten sie die Merkmale Eizahl je Weibchen, Schlüpfraten der Eier, Lebensfähigkeit von Larven und Puppen, Lebensdauer beider Geschlechter, Gewicht der Puppen und Trockengewichte von Weibchen und Männchen. Alle aufgeführten Eigenschaften ließen keinen Zusammenhang mit der Resistenz erkennen. Die empfindlichen Stämme stellten die Gruppen sowohl mit dem geringsten wie mit dem höchsten Lebenspotential, während die resistenten Stämme eine Mittelstellung einnahmen.

In diesen Untersuchungen an der Stubenfliege fanden wir nur in der Arbeit von Babers und Mitarbeitern einen resistenten Stamm, für den seine sensible Ausgangspopulation zum Vergleich mit herangezogen worden war. Dieser resistente Stamm zeichnete sich durch eine herabgesetzte Schlüpfrate der Eier und durch eine geringere Zahl entwickelter Imagines aus. Die Autoren messen diesem Ergebnis aber keine Bedeutung bei, da der zweite von ihnen geprüfte resistente Stamm, dessen sensible Ausgangspopulation zum Vergleich allerdings nicht zur Verfügung stand, Werte aufweist, die denen der sensiblen Stämme gleichkommen.

In den Untersuchungen von Grayson (1951) an der Küchenschabe wurden nur die sensiblen Ausgangsrassen zum Vergleich herangezogen. Er leitete aus einem normal empfindlichen Stamm zwei Selektionsreihen ab, die eine züchtete er auf DDT-Resistenz, die andere auf HCH-Resistenz, und verglich die daraus gewonnenen resistenten Individuen mit denen der sensiblen Ausgangsrassen. In

den Vermehrungsraten zeigte sich in keinem Falle ein Unterschied. Die Länge und Breite der Eihüllen des DDT-resistenten Stammes und die Länge der Hüllen des HCH-behandelten Stammes, dessen Toleranz nur einen sehr niedrigen Grad erreicht hatte, waren jedoch signifikant geringer als im unbehandelten Stamm. In einer weiteren Arbeit (Grayson 1953) behandelte der Autor die Große Seidenpflanzenwanze *Oncopeltus fasciatus* 17 Generationen lang in gleicher Weise mit DDT und mit Toxaphen und erhielt gegen DDT eine 3,7fache, gegen Toxaphen eine 1,8fache Resistenz. In der Eiproduktion zeigten sich zwischen den beiden toleranten und dem sensiblen Stamm keine Differenzen. Mit einer Arbeit an *Drosophila melanogaster* lieferten Sokal und Hunter (1954) einen Beitrag zu der aufgeworfenen Frage. Ein von den Autoren gezüchteter DDT-resistenter Stamm soll die Tendenz zeigen, sich am Rande des Futtermediums bzw. an der Wand der Kulturgläser zu verpuppen, während die Larven des sensiblen Stammes die Futteroberfläche bevorzugen. Dieser Unterschied in der Wahl des Verpuppungsortes ist signifikant. Die Autoren vermuteten eine genetische Korrelation zwischen der erhaltenen Resistenz und der peripheren Verpuppung und konnten ihre Annahme durch weitere Versuche festigen. Sie führten mit sensiblen Fliegen eine Selektion auf Verpuppung am Futterrand durch und erhielten Fliegen, die außer der selektionierten Eigenschaft auch Resistenz gegenüber DDT aufweisen sollen. Knutson (1955) verglich die Fecundität und Lebensdauer der Überlebenden eines *Drosophila*-Wildstammes, der dem Insektizid Dieldrin ausgesetzt war, mit den entsprechenden Eigenschaften von Kontrollfliegen, die mit dem Gift nicht in Berührung gekommen waren. Die überlebenden Weibchen produzierten im Laufe ihres Lebens 7,6% mehr Eier sowie entsprechend größere Mengen an Larven, Puppen und adulten Fliegen. Die erhöhte Nachkommenproduktion konnte auf die längere Lebensdauer dieser Weibchen zurückgeführt werden.

In unseren Untersuchungen, in denen 3 unabhängig voneinander gewonnene DDT-resistente Stämme mit ihren beiden sensiblen Ausgangsstämmen verglichen wurden, haben wir folgende entwicklungsphysiologische und morphologische Merkmale herangezogen: larvale Entwicklungsdauer, auf die Eizahl bezogene Schlüpfraten der Imagines, tägliche Schlüpfraten der Imagines, Fertilität und Lebendgewicht der Imagines, sowie Kopf-, Flügel- und Beinmaße adulter Fliegen.

B. Material und Methoden

Die Versuche wurden an 5 Stämmen von *Drosophila melanogaster* durchgeführt, von denen 2, der Laboratoriumsstamm „Berlin wild" (*K*) und ein in einem Parkgelände in Berlin eingefangener Freilandstamm (*KP*) gegenüber dem Kontaktgift DDT (Dichlordiphenyltrichloräthan) stark empfindlich sind, während die übrigen 3 Stämme, die durch fortlaufende Selektion nach DDT-Einwirkung in getrennten Selektionszuchten aus den beiden Wildstämmen gewonnen worden waren, eine hochgradige Resistenz gegen das Gift entwickelt hatten (Bochnig 1954). Von dem „Berlin wild"-Stamm leiten sich die resistenten Selektionsstämme *S I* und *S II a* ab, von dem Kontrollstamm *KP* der Selektionsstamm *SP*. Die 3 resistenten Stämme waren zu Beginn dieser Versuche über 137 Generationen (*S I*), 87 Generationen (*S II a*) und 118 Generationen (*SP*) selektioniert worden. Der Grad der entwickelten Resistenz zeigte bei den 3 Selektionsstämmen geringe

Unterschiede. Wir haben folgende Reihe ansteigender Resistenz: $K < KP \ll SI < SIIa < SP$.

Die Art unserer Versuche erforderte besondere Sorgfalt bezüglich der Gleichmäßigkeit der Zuchtbedingungen. Alle Ergebnisse wurden an Fliegen gewonnen, deren Eltern zur Zeit der Eiablage 2 bis 3 bzw. 3 bis 4 Tage alt waren. Die Elterntiere wurden in unbetäubtem Zustand zu je einem Pärchen in die Kulturgläser gebracht und 24 bzw. 48 Std zur Eiablage darin belassen. Für einige Untersuchungen erwiesen sich jedoch schon normale Schwankungen der Bevölkerungsdichte von Nachteil. In solchen Fällen haben wir 15 bis 20 Elternpaare zur Eiablage einige Stunden auf Petrischalen gesetzt, die mit einer dünnen Futterschicht bedeckt waren. Die Eier wurden dann zu 40 Stück mit dem Futter herausgehoben und in Zuchtgläser gebracht. Auf diese Weise konnte auch eine Verletzung der Eier durch Berührung ausgeschlossen werden. Die Zuchttemperatur betrug 25° C, nur in einer Versuchsreihe stieg sie bis auf 28° C an.

Zur Gewinnung der Meßwerte wurden Fliegen aus Zuchtgläsern verwandt, in die 40 Eier zur Entwicklung gegeben waren. Die geschlüpften Imagines wurden in 70%igem Alkohol aufbewahrt. Von jedem Tier wurde sodann der Kopf, der rechte Flügel und das rechte 1. und 2. Bein abgetrennt und in absoluten Alkohol eingebracht. Jeweils am Tage darauf wurden davon provisorische Präparate in Paraffinum liquidum hergestellt und die zu messenden Strecken mit Hilfe eines Zeichenapparates der Firma Leitz-Wetzlar in 30- bzw. 60facher Vergrößerung auf Papier übertragen. Die gezeichneten Strecken wurden mit einer Schublehre mit Nonius einteilung gemessen und die erhaltenen Werte auf die natürliche Größe umgerechnet.

Um einen Überblick über die Genauigkeit dieser Meßmethode zu erhalten, wurde eine Fehlerrechnung der Meßwerte einer bekannten Dimension vorgenommen. Es wurden Strecken von der Länge 0,25 mm bei 60facher Vergrößerung 50mal gemessen. Der Mittelwert, der mittlere Fehler und die Streuung betrugen: $M \pm m = 15{,}0 \pm 0{,}52$ mm, $\sigma = \pm 0{,}361$ mm.

C. Versuchsergebnisse

1. Entwicklungsphysiologische Eigenschaften

a) Dauer der larvalen Entwicklung. Wir haben zur Klärung der larvalen Entwicklungsdauer 3 bis 4 Tage alte Einzelpärchen in unbetäubtem Zustand für 24 Std angesetzt und in allen Kulturen 118 Std nach Beginn der Eiablage die Zahl der Puppen ermittelt (Tabelle 1). In allen drei resistenten Stämmen ist bei gleicher Nachkommenzahl die Zahl der Puppen bedeutend erniedrigt, die Differenzen sind gut gesichert. Es zeigte sich, daß die Werte der beiden sensiblen Kontrollstämme ebenfalls voneinander abwichen. Der *KP*-Stamm hatte die höchste Zahl an Puppen aufzuweisen. Die Anzahl der Puppen der aus dem Stamm „Berlin wild" abgeleiteten beiden resistenten Stämme stimmt überein, der Stamm *SP* weist einen noch geringeren Wert auf. Die Differenzen zwischen den beiden resistenten Gruppen lassen sich jedoch nicht sichern, sie liegen innerhalb des zweifachen mittleren Fehlers. Die von uns auf Grund früherer Beobachtungen ausgesprochene Vermutung, daß die Ausbildung der Resistenz von einer Verlängerung der Larvenperiode begleitet wird, konnte somit bei allen untersuchten resistenten Stämmen bestätigt werden.

b) Imaginale Schlüpfraten, bezogen auf die Eizahl. Die Ergebnisse von Untersuchungen, die sich mit fertilitätsbestimmenden Faktoren beschäftigen, sind nach Hadorn und Zeller (1943) vom Alter der Mütter abhängig. Sowohl die Fecundität als auch die Eischlüpfrate, von der die imaginale Schlüpfrate direkt abhängig ist, nimmt bei höherem Alter der Mütter ab. Wir benutzten daher 3 bis 4 Tage alte Weibchen zur Eiablage und ermittelten die Zahl der produzierten Imagines

aus zahlreichen Gelegen von je 40 Eiern. Die Ergebnisse sind in Tabelle 2 angegeben. Es fanden sich weder zwischen dem sensiblen „Berlin wild"-Stamm (K) und den daraus abgeleiteten resistenten Stämmen SI und $SIIa$ ($P = 0{,}19$) noch zwischen dem empfindlichen Wildstamm KP und dem resistenten Stamm SP ($P = 0{,}12$) Differenzen in der Zahl der geschlüpften Imagines. Auch zwischen dem Laboratoriumsstamm „Berlin wild" und dem Freilandstamm „Park" ergaben sich keine Unterschiede. Da wir in den einzelnen Gelegen Schlüpfraten von 65 bis 100% erhielten, wobei jedoch solche zwischen 75 und 95% überwogen, können wir die imaginalen Schlüpfraten unserer Stämme als hoch bezeichnen. Ein seit vielen Generationen durch Bruder-Schwester-Inzucht vermehrter Stamm von HADORN und ZELLER zum Beispiel wies dagegen in allen Zuchten nur mittlere und tiefe Eischlüpfraten von Gelegen junger Weibchen auf. Unsere Untersuchung hat somit ergeben, daß die DDT-Resistenz keinen Einfluß auf die imaginalen Schlüpfraten hat, wenn sie auf eine bestimmte Eizahl bezogen werden.

Tabelle 1. *Dauer der Larvalentwicklung.* Anzahl der Puppen 118 Std nach dem Beginn der Eiablage je Pärchen. K „Berlin wild"-Stamm, SI und $SIIa$ daraus abgeleitete resistente Stämme, KP „Park"-Stamm, SP daraus abgeleiteter resistenter Stamm. n Anzahl der Pärchen

Stamm	n	Anzahl der Puppen
K . . .	114	$14{,}4 \pm 1{,}12$
SI. . .	118	$3{,}1 \pm 0{,}82$
$SIIa$.	84	$3{,}2 \pm 1{,}10$
KP . .	117	$26{,}2 \pm 1{,}82$
SP. . .	107	$1{,}2 \pm 0{,}30$

c) Tägliche Schlüpfraten der Imagines. Die Verzögerung des Verpuppungstermins, die bei unseren resistenten Stämmen unabhängig von ihrer Herkunft zu beobachten war, müßte sich unseres Erachtens auch in verspäteten Schlüpfterminen der Imagines bemerkbar machen, falls diese nicht durch entgegengesetzt gerichtete Prozesse in der Zeit der Puppenruhe wieder aufgehoben werden. Wir haben die Kulturen des unter *a)* beschriebenen Versuchs auch für die Zählung der Imagines ausgewertet, um dasselbe Material zum Vergleich heranziehen zu können. Die geschlüpften Fliegen wurden in 24stündigen Intervallen vom 9. bis 16. Tage nach dem Beginn der Eiablage ausgezählt. In Tabelle 3 sind die täglichen Schlüpfraten jedes Stammes in Prozent seiner Gesamtschlüpfrate angegeben. Für die Werte über 2% wurde der einfache mittlere Fehler, für solche bis zu 2% wurden die Mutungsgrenzen für eine statistische Sicherheit von 99% (WEBER 1956) angegeben. In diesem Versuch zeigte es sich, daß auch die imaginalen Schlüpftermine sowohl der Stämme SI und $SIIa$ als auch des Stammes SP verzögert waren gegenüber ihren sensiblen Ausgangsstämmen. Wie sich schon bei der Zählung der Puppen herausgestellt hatte, sind die Differenzen innerhalb des „Berlin wild"-Stammes nicht so stark ausgeprägt wie zwischen den beiden „Park"-Rassen. Am 9. Tage zeigen beide sensiblen Kontrollstämme höhere Schlüpfraten als die resistenten Stämme, am 10. Tage liegen die Werte der drei „Berlin wild"-Stämme K, SI, $SIIa$ und des

Tabelle 2. *Imaginale Schlüpfraten, bezogen auf die Eizahl.*
(Bezeichnungen der Stämme wie bei Tabelle 1)

Stamm	Zahl der		Imagines in % der Eizahl	P
	Eier	Imagines		
K . . .	760	682	89,7	
SI. . .	720	621	86,2	0,19
$SIIa$. .	720	686	95,3	
KP . .	760	663	87,2	0,12
SP. . .	640	508	79,4	

SP-Stammes auf gleicher Höhe, die Schlüpfrate des *KP*-Stammes ist bereits abgesunken. An allen späteren Tagen bis zum 16. Tage schlüpfen in den resistenten Stämmen stets mehr Fliegen als in den sensiblen Stämmen. Auch zwischen den beiden Kontrollstämmen *K* und *KP* zeigen sich Unterschiede in der Schlüpfrate, wie sie auf Grund des unter *a)* beschriebenen Versuches zu erwarten sind. Die Imagines des *KP*-Stammes schlüpfen in größerer Anzahl am 9. Tage der Entwicklungsperiode, an allen anderen Tagen ist die Schlüpfrate des *K*-Stammes höher. Die Streuung der Einzelwerte war in diesen Versuchsreihen besonders groß. Wahrscheinlich werden die Ergebnisse schon durch geringe Schwankungen in den Außenbedingungen, in der Hauptsache wohl durch Temperaturveränderungen, beeinflußt. Aus diesem Grunde sind die mittleren Fehler z.T. sehr hoch und erlauben innerhalb der 3 „Berlin wild"-Stämme, bei denen die Differenzen nicht so stark ausgeprägt sind wie zwischen den beiden „Park"-Rassen, keine statistische Sicherung der an den aufeinanderfolgenden Tagen erhaltenen Ergebnisse. Die Abweichungen der resistenten Stämme innerhalb der einzelnen Versuchsreihen zeigen jedoch stets die gleiche Richtung und annähernd gleiche Größenordnung. Die Fortführung der Versuche hat inzwischen ergeben, daß die Differenzen in der Entwicklungsgeschwindigkeit zwischen den sensiblen und den resistenten Stämmen noch größer werden, wenn die Entwicklung in Zimmertemperatur (18 bis 21° C) erfolgt.

Es hat sich also gezeigt, daß der Schlüpftermin der resistenten Imagines entsprechend ihrer verlängerten larvalen Entwicklungsdauer gegenüber den sensiblen Fliegen hinausgeschoben ist.

d) Anzahl der Nachkommen. In einer weiteren Versuchsreihe ermittelten wir die Fertilität[1] der von uns untersuchten Stämme. Wir setzten von jedem Stamm 10 Kulturen mit je einem Pärchen im Alter von 2 bis 3 Tagen an und brachten diese in Abständen von 2 Tagen auf frische Futtergläschen; insgesamt wurden so 5 Serien gewonnen. Am 14. und am 18. Tage nach Beginn der Eiablage wurden die geschlüpften Nachkommen gezählt. Aus Tabelle 4a ist zu ersehen, daß in der Fertilität keine Unterschiede zwischen den beiden sensiblen und den drei resistenten Stämmen bestehen. Die aus den 5 Serien errechneten Mittelwerte zeigen

[1] Wir verstehen unter Fertilität mit Pearl (1932) die Anzahl der produzierten Imagines.

Tabelle 3. *Tägliche Schlüpfraten.* Tägliche imaginale Schlüpfraten von Ein-Pärchen-Zuchten in Prozent ihrer Gesamtschlüpfrate vom 9. bis 16. Tag nach der Eiablage. (Bezeichnungen der Stämme wie bei Tabelle 1)

Stamm	9. Tag	10. Tag	11. Tag	12. Tag	13. Tag	14. Tag	15. Tag	16. Tag
K	29,3 ± 6,38	56,2 ± 4,73	9,3 ± 1,16	3,0 ± 0,83	0,92 bis 1,63	0,25 bis 0,67	0,16 bis 0,51	0,02 bis 0,35
S I	13,9 ± 4,09	59,0 ± 2,18	16,6 ± 1,99	4,9 ± 1,01	2,6 ± 0,62	0,92 bis 1,66	0,35 bis 0,86	0,34 bis 0,84
S II a . . .	19,3 ± 5,74	50,5 ± 2,06	14,2 ± 2,53	6,2 ± 1,56	3,8 ± 0,86	2,7 ± 0,76	2,1 ± 0,85	0,96 bis 1,80
KP	57,9 ± 3,89	31,7 ± 3,62	7,3 ± 1,44	1,72 bis 2,70	0,18 bis 0,57	0,04 bis 0,30	0,08 bis 0,38	0,0002 bis 0,19
SP	9,6 ± 2,36	54,2 ± 2,58	21,6 ± 2,34	6,1 ± 1,06	2,9 ± 0,65	2,2 ± 0,69	1,37 bis 2,22	0,75 bis 1,41

zwar im Extrem bei der Zuchttemperatur von 25° C einen Fehlbetrag von 15 Geschlüpften für den *S I*-Stamm, doch ist diese Differenz statistisch nicht gesichert und der stärker resistente Stamm *S IIa* zeigt praktisch den gleichen Wert wie *K*. Auch zwischen den Stämmen *KP* und *SP* ist die Differenz nicht groß. Einzelne sterile Kulturen waren nur im *S I*- und *SP*-Stamm vorhanden.

Tabelle 4a. *Fertilitätsprüfung.* Anzahl der Nachkommen je Pärchen in 5 aufeinanderfolgenden Zuchtserien in Abständen von 2 Tagen (Serie I—V) bei Entwicklungstemperaturen von 25° C und etwa 28° C. Anzahl der Pärchen: je 10. (Bezeichnungen der Stämme wie bei Tabelle 1)

Stamm	Serie	Nachkommen je Pärchen 25°	Nachkommen je Pärchen etwa 28°
K	I	94,7	104,2
	II	103,9	76,8
	III	88,8	40,1
	IV	87,7	33,6
	V	78,9	24,5
	I—V	90,8 ± 3,6	59,2 ± 6,0
S I	I	94,1	82,9
	II	74,3	70,6
	III	73,0	53,2
	IV	65,0	58,5
	V	72,3	56,7
	I—V	76,2 ± 3,0	65,4 ± 3,9
S IIa	I	96,4	95,4
	II	94,0	74,1
	III	82,3	46,4
	IV	92,3	26,4
	V	75,2	52,0
	I—V	89,1 ± 2,9	67,1 ± 6,2
KP	I	86,9	64,6
	II	89,1	45,4
	III	81,2	44,6
	IV	82,2	40,8
	V	75,0	50,8
	I—V	83,1 ± 3,8	49,5 ± 3,5
SP	I	99,9	69,2
	II	88,0	43,2
	III	66,1	24,9
	IV	73,6	19,0
	V	46,9	17,0
	I—V	75,4 ± 4,9	36,0 ± 4,1

Tabelle 4b. *Fertilitätsprüfung.* Anzahl der Nachkommen je Pärchen nach 24stündiger Eiablage. (Bezeichnungen der Stämme wie bei Tabelle 1). *n* Anzahl der Pärchen

Stamm	*n*	Nachkommen	% ♀♀
K . . .	124	46,8 ± 2,7	50,1
S I. . .	128	41,6 ± 2,4	50,6
S IIa .	94	47,1 ± 5,1	49,9
KP . .	117	45,8 ± 1,7	49,6
SP . .	117	46,9 ± 3,0	50,5

Aus Tabelle 4a ist weiterhin ersichtlich, daß die Zahl der Nachkommen in allen Stämmen mit dem Alter der Eltern abnimmt. Diese Abnahme ist — bis auf den Stamm *SP* — nicht sehr stark, da das Alter der Eltern in der V. Serie erst 10 bis 11 Tage betrug. Die Ergebnisse für die bei 25° C und bei etwa 28° C aufgezogenen Kulturen stimmen grundsätzlich miteinander überein, lediglich die absoluten Nachkommenzahlen sind bei der höheren Zuchttemperatur geringer.

Die Ein-Pärchen-Kulturen, die bereits für die Versuche *a)* und *c)* ausgewertet worden waren, dienten auch für die Ermittlung der Nachkommenzahlen nach 24stündiger Eiablage (Tabelle 4b). Es zeigt sich hier das auf Grund der vorigen Ergebnisse erwartete Bild: keine Differenzen in der Zahl der Nachkommen bei den verschiedenen Stämmen. Außerdem ist der Prozentsatz der Weibchen unter den geschlüpften Fliegen angegeben. Er beträgt in jedem Stamm um 50%. Die Fertilität der beiden sensiblen Ausgangsstämme wurde also durch die Ausbildung der DDT-Resistenz nicht beeinflußt.

e) Lebendgewicht der Imagines. Wir haben mehrere Gruppen von je 100 bis zu 2 Tage alten Weibchen und Männchen aus den Ein-Pärchen-Kulturen und aus den Kulturen, in denen 40 Eier je Glas zur Entwicklung gekommen waren, gewogen und die Mittelwerte für die verschiedenen Stämme in Tabelle 5 dar-

gestellt. Die statistische Auswertung erfolgte nach dem t-Verfahren. In allen Stämmen erreichen die Männchen etwa $^2/_3$ des Gewichtes der Weibchen. Die drei resistenten Gruppen jedes Geschlechtes sind signifikant schwerer als die der beiden sensiblen Vergleichsstämme. Während sich sowohl die Weibchen als auch die Männchen der drei resistenten Gruppen untereinander im Gewicht kaum unterscheiden, sind die sensiblen „Park"-Weibchen (KP) etwas leichter als die „Berlin wild"-Weibchen (K) und die „Park"-Männchen bedeutend leichter als die „Berlin wild"-Männchen. Obwohl die Differenzen zwischen den sensiblen und resistenten Gruppen im weiblichen Geschlecht fast immer größer sind als bei den Männchen, sind die P-Werte bei den Männchen kleiner. Das ist bedingt durch die größere Streuung der Gewichte der Weibchen, die wahrscheinlich durch den zeitlich sich schnell verändernden Zustand der Ovarien stärkeren Schwankungen unterworfen sind.

Tabelle 5. *Lebendgewicht der Imagines.* Gewicht in Milligramm von je 100 Weibchen und 100 Männchen. (Bezeichnungen der Stämme wie bei Tabelle 1.) n Anzahl der gewogenen Gruppen je Stamm

Stamm	n	Gewicht in mg je 100 Fliegen	P
		Weibchen	
K . . .	11	137,5	
SI. . .	11	154,4	0,003
$SIIa$.	9	158,5	0,004
KP . .	11	130,0	
SP. . .	11	152,4	0,0005
		Männchen	
K . . .	11	96,4	
SI. . .	11	104,9	$<0{,}0002$
$SIIa$.	9	106,2	0,0002
KP . .	11	80,5	
SP. . .	10	101,1	$<0{,}0002$

Dieses Ergebnis kann mit der Verlängerung der Larvalperiode der resistenten Stämme in Zusammenhang stehen, durch die auch eine Erhöhung der Nahrungsaufnahme möglich ist. Nach Dobzhansky (1924) hat der Ernährungszustand der Weibchen einen Einfluß auf die Zahl ihrer Ovariolen. Innerhalb einer Kultur weisen die zuerst geschlüpften weiblichen Fliegen, die während ihrer Entwicklungszeit bessere Ernährungsbedingungen vorfinden als die später schlüpfenden, eine höhere Anzahl Ovariolen auf als jene. Wir haben daher bei unseren Stämmen die Ovariolen gezählt.

Tabelle 6. *Eiröhrenzahl je Ovar; sensible und resistente Stämme jeweils zusammengefaßt.* n Anzahl der untersuchten Ovarien

n	Sensible Stämme $M \pm m$	n	Resistente Stämme $M \pm m$
9	$16{,}1 \pm 0{,}26$	21	$16{,}0 \pm 0{,}16$

Es fanden sich jedoch keine Unterschiede zwischen den sensiblen und resistenten Stämmen (Tabelle 6). Da angenommen werden kann, daß sowohl die Stämme K und KP als auch die resistenten Gruppen SI, $SIIa$ und SP in unseren Versuchen ihrem Entwicklungstempo entsprechend optimal ernährt wurden, weisen vermutlich sensible und resistente Weibchen bereits die maximale Anzahl Ovariolen auf, so daß durch die noch reichlichere Ernährung der resistenten Larven die Ovariolenanzahl nicht mehr gesteigert werden konnte. Die Beobachtung, daß die Fliegen der resistenten Stämme größer sind als die der sensiblen, hat sich somit durch die Ermittlung des Gewichtes der Imagines bestätigen lassen.

2. Morphologische Eigenschaften

Nachdem sich herausgestellt hat, daß mit der Verlängerung der larvalen Entwicklungsperiode bei allen resistenten Stämmen eine Zunahme des Frischgewichtes der Imagines einhergeht — wobei dem Stamm KP mit der kürzesten

Entwicklungsdauer das leichteste Gewicht zukommt —, erhebt sich die Frage, ob bzw. wie sich solche Differenzen morphologisch auswirken. Es wurden deshalb einige Körperteile der sensiblen und resistenten Stämme biometrisch untersucht. Als Kriterien wählten wir folgende 7 Merkmale: Kopfbreite, Länge und Breite des rechten Flügels und Femur- und Tibialänge des 1. und 2. rechten Beines.

Diese Körperteile wurden bei je 80 bis 100 Individuen beider Geschlechter gemessen, wobei zur statistischen Auswertung das t-Verfahren herangezogen wurde. In der Abb. 1 sind die Meßpunkte dargestellt. Als Kopfbreite diente die breiteste Ausdehnung, der äußerste Augenabstand; als Meßpunkte für die Ermittlung der Flügellänge wählten wir die Gabelung der 2. und 3. Längsader und die Mündung der 3. Längsader in den Flügelrand; bei der Messung der Flügelbreite haben wir uns wegen der größeren Sicherheit in der Erkennung der Meßpunkte auf die Mündungsstellen der 2. und 5. Längsader in den Flügelrand festgelegt. Korrelationsuntersuchungen über die Rechts-Linksbeziehungen von Strecken der verschiedensten Flügelbezirke und der Tibia bei der Wildform von *Drosophila* (RIEDEL 1934) ergaben

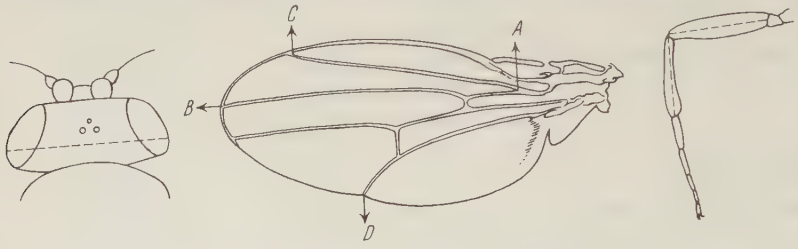


Abb. 1. Meßpunkte für die Ermittlung der Kopfbreite (äußerster Augenabstand), Flügellänge (A—B), Flügelbreite (C—D), Femur- und Tibialänge

bei den einzelnen Individuen zwar keine vollkommene bilaterale Symmetrie, der durch die Zusammenfassung aller Messungen errechnete Mittelwert jeder Meßreihe zeigte jedoch für die Flügelbezirke eine fast ideale Korrelation, die Korrelationswerte für die Tibia waren nicht so gut. Da wir über ein ausgedehntes Untersuchungsmaterial verfügen, haben wir uns bei den Messungen der bilateral-symmetrisch ausgebildeten Körperteile wie Flügel und Beine auf die der rechten Körperhälfte beschränkt.

Die Ergebnisse der Messungen sind in Tabelle 7 dargestellt. Unter dem in Millimeter angegebenen Mittelwert jeder Meßreihe ist der prozentuale Zuwachs gegenüber den Werten der jeweiligen sensiblen Vergleichsgruppe eingesetzt. Die resistenten „Berlin wild"-Stämme *S I* und *S IIa* zeigen, entsprechend der geringeren Gewichtserhöhung des *S I*-Stammes, eine mäßige Steigerung der Meßwerte im *S I*-Stamm und eine höhere Steigerung im *S IIa*-Stamm. In einigen Meßwerten konnte gegenüber dem Kontrollstamm keine signifikante Größenzunahme festgestellt werden, so bei den Weibchengruppen in der Flügellänge und im *S I*-Stamm in der Femurlänge des 2. Beines, bei den Männchen im *S I*-Stamm in der Femur- und Tibialänge des 1. und 2. Beines. Der sensible „Park"-Stamm unterscheidet sich in vielen Merkmalen von dem sensiblen „Berlin wild"-Stamm. Bei ihm finden sich in beiden Geschlechtern breitere Flügel und bei den Weibchen auch längere Tibien. Alle anderen Meßwerte — bis auf die Kopfbreite der Weibchen — sind geringer als im *K*-Stamm. Der resistente *SP*-Stamm zeigt gegenüber seinem Ausgangsstamm *KP* in beiden Geschlechtern eine größere Kopfbreite sowie längere Femura beider Beine. Im männlichen Geschlecht ist außerdem die Flügellänge und -breite vergrößert. Während sich aber die Tibienlängen beider Beine bei den beiden Männchengruppen nicht unterscheiden, zeigt sich bei den

Tabelle 7. *Körpermaße.* Die Werte sind in Millimeter angegeben und stellen das Mittel von je 80 bis 100 Messungen dar. Unter den Maßen der resistenten Stämme ist der prozentuale Zuwachs gegenüber den sensiblen Vergleichsgruppen angeführt. (Bezeichnungen der Stämme wie bei Tabelle 1)

Stamm	Kopfbreite	P	Flügellänge A—B	P	Flügelbreite C—D	P	1. Bein Femur	P	1. Bein Tibia	P	2. Bein Femur	P	2. Bein Tibia	P
Weibchen														
K	0,853		1,909		1,057		0,581		0,518		0,693		0,694	
S I . . .	0,889	<0,0002	1,918	0,29	1,131	<0,0002	0,592	0,004	0,526	0,0008	0,698	0,10	0,705	0,004
	(4,2%)		(0,05%)		(7,0%)		(1,9%)		(1,5%)		(0,7%)		(1,6%)	
S IIa . .	0,920	<0,0002	1,942	0,04	1,150	<0,0002	0,610	0,0004	0,539	0,0009	0,720	0,0008	0,730	0,0002
	(7,9%)		(1,7%)		(8,8%)		(5,0%)		(4,1%)		(3,9%)		(5,2%)	
KP . . .	0,854		1,899		1,094		0,574		0,529		0,675		0,709	
SP . . .	0,895	<0,0002	1,896	0,77	1,110	0,02	0,598	<0,0002	0,520	0,0045	0,704	<0,0002	0,700	0,015
	(4,8%)		—		(1,5%)		(4,2%)		—		(4,3%)		—	
Männchen														
K	0,793		1,651		0,938		0,565		0,507		0,653		0,664	
S I . . .	0,826	<0,0002	1,703	<0,0002	1,025	<0,0002	0,571	0,035	0,510	0,25	0,662	0,06	0,664	—
	(4,2%)		(3,2%)		(9,3%)		(1,1%)		(0,6%)		(1,4%)		—	
S IIa . .	0,855	<0,0002	1,743	<0,0002	1,043	<0,0002	0,592	<0,0002	0,522	0,01	0,682	0,0015	0,687	0,004
	(7,8%)		(5,6%)		(11,2%)		(4,8%)		(3,0%)		(4,4%)		(3,5%)	
KP . . .	0,779		1,625		0,952		0,538		0,496		0,624		0,653	
SP . . .	0,826	<0,0002	1,707	<0,0002	1,022	<0,0002	0,571	<0,0002	0,500	0,23	0,665	<0,0002	0,656	0,44
	(6,0%)		(5,0%)		(7,4%)		(6,1%)		(0,8%)		(6,6%)		(0,5%)	

resistenten Weibchen eine mäßige Verkürzung dieser Körperteile. Es ist somit aus diesen Werten ersichtlich, daß die Größenzunahme der resistenten Stämme nicht gleichmäßig alle zur Untersuchung herangezogenen Körperteile betrifft, in einer Gruppe hat sich sogar eine Verkleinerung eines Merkmals ergeben.

D. Diskussion

Die Untersuchung entwicklungsphysiologischer und morphologischer Merkmale bei zwei DDT-sensiblen und drei aus diesen in unabhängigen Selektionsreihen abgeleiteten resistenten Stämmen von *Drosophila melanogaster* hat ergeben, daß sich einige Eigenschaften zusammen mit der Empfindlichkeitsabnahme gegenüber DDT verändert haben, andere aber nicht.

Als Ursachen dieser simultanen Eigenschaftsänderungen können zwei Möglichkeiten in Betracht gezogen werden. 1. Es handelt sich um eine zufällige Mitselektion von Merkmalen, die mit der Resistenz in keinem Zusammenhang stehen. Diese Möglichkeit wird jedoch durch die Tatsache, daß in allen drei resistenten Stämmen übereinstimmend und grundsätzlich die gleichen physiologischen und morphologischen Abweichungen von den beiden sensiblen Kontrollstämmen aufgetreten sind, von vornherein unwahrscheinlich gemacht. 2. Es handelt sich um einen kausalen Zusammenhang zwischen der Resistenz und den abgeänderten Eigenschaften. Diese Möglichkeit hat aus den gleichen Gründen die größere Wahrscheinlichkeit für sich. Die Verlängerung der larvalen Entwicklungsperiode, der spätere Schlüpftermin der Imagines und das höhere Gewicht adulter Fliegen stehen offenbar entwicklungsphysiologisch in Zusammenhang, wobei die Verzögerung des Verpuppungstermins die Voraussetzung für die Veränderungen der anderen Merkmale sein mag.

Die Metamorphose wird bei Dipteren durch Hormone gesteuert (PFLUGFELDER 1952). Es ist nicht anzunehmen, daß sich die Funktion des Zentralteils der Ringdrüse (Corpora allata) von der Funktion der Corpora allata anderer Insekten unterscheidet, die im frühen Larvenstadium in der Ausschüttung von Juvenilhormon besteht, welches die Verpuppung hemmt; in extremen Fällen überschüssiger Hormonausschüttung kann es sogar zu überzähligen Häutungen, verbunden mit Riesenwuchs der Larven, kommen. Außerdem wirkt sich dieses Hormon auf den Stoffwechsel der Fliegen aus. Wenn es zutrifft, daß die Verlängerung der larvalen Entwicklungsdauer in kausalem Zusammenhang mit den Resistenzerscheinungen steht, so deuten sich hiermit auch Beziehungen zwischen der Resistenz und dem neuroendokrinen System an. Es gibt aber bei *Drosophila* auch zahlreiche Mutationen, die u.a. eine Entwicklungsverzögerung bedingen. Ob diese Wirkung immer hormonell ausgelöst wird, ist jedoch nicht bekannt. Die Möglichkeit, daß die unterschiedliche Entwicklungsgeschwindigkeit durch eine mehr oder weniger dichte Bevölkerung der Kulturgefäße hervorgerufen sein könnte, wurde in unseren Versuchen ausgeschlossen. Es fanden sich nach 24stündiger Eiablage gleichalter Pärchen zwischen den verschiedenen Stämmen keine Differenzen in der Zahl der Nachkommen (Tabelle 4b).

Die morphologischen Untersuchungen haben gezeigt, daß die resistenten Fliegen nicht ihrem höheren Gewicht entsprechend proportional vergrößert sind, sondern daß sich der Zuwachs auf einige Körperteile beschränkt hat. Er ist in den von uns untersuchten Organen zudem sehr unterschiedlich und betrug im

Höchstfalle um 11%. Das allometrische Wachstum der Körperteile der resistenten Stämme hat im Vergleich zu den Dimensionen der sensiblen Stämme Modifikationen der Größe und Form der Fliegen zur Folge. Henke (1947, 1948) hat die Ursachen solcher Modifikationen am Flügel von *Drosophila* untersucht. Während der Entwicklungsstadien der Fliegen ließen sich sensible Perioden nachweisen, in denen durch genau dosierte Temperaturreize ganz bestimmte Modifikationstypen ausgelöst werden konnten. Ähnliche Vorgänge spielen sich auch an den anderen Organanlagen ab, nur ist das Entwicklungsstadium, in dem die einzelnen Organanlagen labil sind, verschieden. So erreicht nach Bodenstein (1941) das Regulationsvermögen der Beinimaginalscheiben schon im Ei seinen Abschluß. Die Qualität der Reize, die die morphologischen Besonderheiten der resistenten Fliegen bedingen, ist endogener Natur. Wahrscheinlich sind die zwischen sensiblen und resistenten Organismen vorhandenen physiologischen Unterschiede (Metcalf 1955) dafür verantwortlich zu machen.

Wie eingangs erwähnt, sind die von verschiedenen Autoren gewonnenen widersprechenden Befunde an Stubenfliegen bezüglich der Dauer des Entwicklungszyklus und der Veränderung anderer Merkmale bei resistenten Stämmen höchstwahrscheinlich darauf zurückzuführen, daß sie meist mit sensiblen Fliegen anderer geographischer Provenienz verglichen wurden. Der unterschiedliche Allelenbestand solcher Stämme läßt aber Vergleiche dieser Art nicht zu. Dafür bietet die vorliegende Untersuchung ein Beispiel. Wir haben bereits früher (Bochnig 1954) darauf hingewiesen, daß das äußere Erscheinungsbild der „Park"-Fliegen von dem Aussehen der Imagines des „Berlin wild"-Stammes abweicht. Die beiden Stämme „Berlin wild" und „Park" unterscheiden sich von vornherein in ihrem Genpool. Es ist daher damit zu rechnen, daß sowohl zwischen den sensiblen als auch den resistenten Stämmen beider Gruppen Differenzen in den hier untersuchten Merkmalen vorhanden sind und daß auch die Sensibilität bzw. Resistenz der verschiedenen Stämme unterschiedliche Werte aufweist bzw. erreicht. So ergab sich entsprechend der zunehmenden Resistenz der „Berlin wild"-Stämme $K \ll SI < SIIa$ eine stufenweise Änderung der untersuchten Eigenschaften; die Unterschiede zwischen den Stämmen K und SI waren geringer als zwischen den Stämmen K und $SIIa$. Lediglich die Dauer der Larvalentwicklung unterschied sich in den beiden resistenten Stämmen SI und $SIIa$ nicht. Die Differenzen in der Empfindlichkeit gegenüber DDT zwischen den „Berlin wild"-Stämmen K und $SIIa$ sowie zwischen den „Park"-Stämmen KP und SP sind sehr ähnlich; die Unterschiede in der Dauer der Larvalentwicklung, den täglichen imaginalen Schlüpfraten und im Gewicht der Imagines sind aber in den beiden „Park"-Stämmen etwas größer. Dagegen ist der prozentuale Zuwachs der Körperteile des SP-Stammes fast in allen Merkmalen geringer als im Stamm $SIIa$. Es hat sich also gezeigt, daß innerhalb des Stammes „Berlin wild" eine Beziehung besteht zwischen der Stärke der Resistenz und der Veränderung einiger Eigenschaften, daß aber die Plastizität bei Stämmen verschiedener Herkunft unterschiedlich ist. Wenn wir andererseits den sensiblen „Berlin wild"-Stamm K mit dem im Verhältnis dazu etwas widerstandsfähigeren „Park"-Stamm KP vergleichen, so finden wir bei letzterem eine kürzere larvale Entwicklungsdauer, einen früheren Schlüpftermin und ein leichteres Gewicht der Imagines sowie z. T. kleinere Dimensionen bei morphologischen Merkmalen, also das Gegenteil dessen,

was auf Grund unserer Ergebnisse an den resistenten Stämmen zu erwarten gewesen wäre. Aus genetischen Gründen ist daher der Aussagewert von Ergebnissen, die an genetisch unterschiedlichem Material gewonnen wurden, nur gering. Unsere eigenen Befunde machen es jedoch wahrscheinlich, daß auch in den Fällen, in denen bei Stubenfliegen eine Verzögerung der Entwicklungsgeschwindigkeit resistenter Populationen festgestellt wurde, kein Zufallsergebnis vorliegt, sondern daß diesen Befunden eine reelle Bedeutung zukommt. Es muß aber bemerkt werden, daß die negativen Befunde anderer Autoren nicht unbedingt auf einem inkomparablen Ausgangsmaterial beruhen müssen, sondern daß bei der Insektizidresistenz auch andere physiologische Prozesse verändert sein könnten.

Auch zu der Beantwortung einer weiteren Frage tragen die hier durchgeführten Untersuchungen bei. Es wurde in einer Reihe von Arbeiten gezeigt, daß resistente Insektenpopulationen ihre Resistenz teilweise oder völlig eingebüßt hatten, nachdem sie dem Insektizid längere Zeit nicht mehr ausgesetzt waren. Als Ursache dafür ist eine Gegenselektion in normalem, also DDT-freiem Milieu in Betracht zu ziehen, indem die zusammen mit der Widerstandsfähigkeit veränderte larvale Entwicklungsdauer einen Konkurrenznachteil für die resistenten Populationen mit sich bringt.

Zusammenfassung

1. Zwischen 2 DDT-sensiblen und 3 resistenten Stämmen von *Drosophila melanogaster*, die durch unabhängige Selektionszucht auseinander abgeleitet waren, ergaben sich entwicklungsphysiologische und morphologische Differenzen in gleicher Richtung, aber unterschiedlicher Expressivität.

2. Die larvale Entwicklungsdauer war bei allen resistenten Stämmen verlängert. In Übereinstimmung damit schlüpften die resistenten Imagines später, ihr Lebendgewicht war erhöht.

3. Die Schlüpfraten der Imagines, bezogen auf eine bestimmte Eizahl, sowie die Fertilität der Stämme zeigten keine Unterschiede.

4. Mehrere Körperteile der resistenten Stämme ließen im Vergleich zu den sensiblen Rassen eine allometrische Wachstumszunahme erkennen. Der prozentuale Zuwachs der einzelnen Merkmale zeigte starke Unterschiede. Nur bei einem resistenten Stamm fand sich in einem Merkmal — den Tibien — eine Verkürzung gegenüber der sensiblen Vergleichsgruppe.

5. Es wird diskutiert, welche möglichen Zusammenhänge zwischen der DDT-Resistenz und den abgeänderten Eigenschaften bestehen und welche Ursachen ihnen zugrunde liegen.

Die Untersuchungen wurden mit Unterstützung durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft durchgeführt.

Literatur

BABERS, F. H., J. J. PRATT and M. WILLIAMS: Some biological variations between strains of resistant and susceptible house flies. J. Econ. Entomol. **46**, 914 (1953). — BOCHNIG, V.: Genetische Untersuchungen zur DDT-Resistenz an *Drosophila melanogaster*. Z. Vererbungslehre **86**, 185 (1954). — BODENSTEIN, D.: Investigations on the problem of metamorphosis. 8. Studies on leg determination in insects. J. of Exper. Zool. **86**, 87 (1941). — DOBZHANSKY, TH.: Über den Bau des Geschlechtsapparates einiger Mutanten von *Drosophila melanogaster*. Z. Vererbungslehre **34**, 245 (1924). — GRAYSON, J. M.: Response of the German cockroach to sublethal concentrations of DDT and benzene hexachloride. J. Econ. Entomol. **44**, 315

(1951). — Selection of the large milkweed bug through seventeen generations for survival to sublethal concentrations of DDT and toxaphene. J. Econ. Entomol. **46**, 888 (1953). — Hadorn, E., u. H. Zeller: Fertilitätsstudien an *Drosophila melanogaster*. I. Untersuchungen zum altersbedingten Fertilitätsabfall. Arch. Entw.mechan. **142**, 276 (1943). — Henke, K.: Einfache Grundvorgänge in der tierischen Entwicklung. I. Über Zellteilung, Wachstum und Formbildung in der Organentwicklung der Insekten. Naturwiss. **34**, 180 (1947). — Über Ordnungsvorgänge in der Spätentwicklung der Insekten. Rev. suisse Zool. **55**, 319 (1948). March, R. B., and L. L. Lewallen: A comparison of DDT-resistant and nonresistant house flies. J. Econ. Entomol. **43**, 721 (1950). — Metcalf, R. L.: Physiological basis for insect resistance to insecticides. Physiologic. Rev. **35**, 197 (1955). — Pearl, R.: The influence of density of population upon egg production in *Drosophila melanogaster*. J. of Exper. Zool. **63**, 57 (1932). — Pflugfelder, O.: Entwicklungsphysiologie der Insekten. Leipzig: Akademische Verlagsgesellschaft 1952. — Pimentel, D., J. E. Dewey and H. H. Schwardt: An increase in the duration of the life cycle of DDT-resistant strains of the house fly. J. Econ. Entomol. **44**, 477 (1951). — Riedel, H.: Der Einfluß der Entwicklungstemperatur auf Flügel- und Tibialänge von *Drosophila melanogaster* (wild, vestigial und die reziproken Kreuzungen). Arch. Entw.mechan. **132**, 463 (1934). — Sokal, R. R., and P. E. Hunter: Reciprocal selection for correlated quantitative characters in *Drosophila*. Science (Lancaster, Pa.) **119**, 649 (1954). — Varzendeh, M., W. N. Bruce and G. C. Decker: Resistance to insecticides as a factor influencing the biotic potential of the house fly. J. Econ. Entomol. **47**, 129 (1954). — Weber, E.: Grundriß der biologischen Statistik für Naturwissenschaftler und Mediziner, 2. Aufl. Jena: Gustav Fischer 1956. — Wiesmann, R.: Untersuchungen über das physiologische Verhalten von *Musca domestica* L. verschiedener Provenienzen. Mitt. schweiz. entomol. Ges. **20**, 484 (1947).

Dr. Veronika Bochnig, Berlin-Dahlem, Ehrenbergstr. 26—28,
Max-Planck-Institut für vergl. Erbbiologie und Erbpathologie

Zeitschrift für indukt. Abstammungs- und Vererbungslehre, Bd. 87, S. 708—721 (1956)

Department of Genetics, University of California, Davis, California, USA

A CYTOGENETIC ANALYSIS OF THE LOZENGE PSEUDOALLELES IN DROSOPHILA

By

M. M. Green and K. C. Green

(Eingegangen am 30. August 1956)

1. Introduction

Implicit in the theory of the gene is the notion that the chromosomes are subdivided into a number of regions each of which can be labelled a gene. The experimental basis for this concept was derived from two lines of evidence: (1) the consistent segregation of phenotypic allelic mutants to separate gametes, and (2) the occurrence of crossing over between phenotypically nonallelic mutants. From these observations it followed that crossing over could be used as an empirical measure of the distance between genes and concurrently as a tool for specifying the linear limits occupied by a single gene. Following the discovery of pseudoallelism, questions were raised concerning the utility of the crossing over event as a method for determining the limits of the gene. The diametrically opposed points of view engendered by this discovery have been discussed at length elsewhere by a number of investigators and need not be repeated here (Goldschmidt 1951, 1955; Green 1955; Lewis 1951, 1954, 1955; Pontecorvo 1952, 1955; Stephens 1951, 1955). It will suffice to point out that, to date, no detailed recombination analysis of a large number of phenotypic alleles in higher organisms has been presented. Such an analysis is pertinent to resolving the question of whether within a pseudoallelic array a finite number of recombinationally determined loci occur. Evidence from microorganisms (Benzer 1955, Demerec et al. 1955) suggests that a multiplicity of loci occur, and it is difficult to assign a limit to the number of recombinationally defined loci. Since in an earlier analysis of the lozenge pseudoalleles, three loci were found (Green and Green 1949), and since lozenge mutants recur frequently, this material is favorable for a detailed recombination analysis designed to determine the maximum number of lozenge loci.

2. The lozenge phenotype

A total of eighteen independent lozenge (*lz*) mutants are included in this study. All are sex-linked and recessive. The immediately obvious phenotypes associated with *lz* mutants include alterations in the structure and pigmentation of the eyes, in the accessory female genitalia (spermathecae and pars ovariae) and in the tarsal claws. Anders (1955) has reviewed and discussed the numerous morphological studies of the *lz* phenotype obviating the necessity for repetition here. He reported, in addition, that certain antennal sensory organs are absent or reduced in lz^{ts}. It will suffice to note here that the eighteen *lz* mutants can be classified into the following three phenotypic classes:

Class I: Eye size reduced; eye surface "rough"; red eye pigment distributed over entire eye, tarsal claws reduced; in ♀♀ spermathecae and pars ovariae absent.

Class II: Eye size sharply reduced; eye surface smooth; red eye pigment sparse and confined primarily to the margin of the eye; tarsal claws vestigial; in ♀♀ spermathecae and pars ovariae absent.

Class III: Eye size sharply reduced; eye surface smooth; red eye pigment distributed over the entire eye; tarsal claws normal; in ♀♀ spermathecae and pars ovariae present and normal.

In table 1, the eighteen *lz* mutants have been listed according to their phenotypic classification together with their mode of origin. For simplicity the several *lz* mutants discussed will be designated herein by their superscript notation, e.g. lz^{s} as *g*, lz^{36} as *36*, etc. It is pertinent to note here that while it is often difficult to distinguish phenotypically between independent mutants assigned to the same class, it is possible to distinguish unequivocally between mutants of different classes. Thus the mutants of Class I—*1*, *g*, *46* and *34* are all very similar phenotypically and difficult to distinguish phenotypically. Similarly the mutants *s*, *36*, *48c*, *48e* and *49g* of Class II are essentially inseparable phenotypically; and the two mutants of Class III are inseparable from each other. However, there is no problem in discriminating phenotypically between *g* and *s* and *50e*.

Table 1. *The distribution of lz mutants into three phenotypic classes. (See text for a description of the classes) Origin of each mutant given by (s) = spontaneous, (x) = x-ray induced, (m) = mustard gas induced*

Class I	Class II	Class III
1 (s)	*s* (x)	*50e* (x)
37 (s)	*36* (s)	*49h* (x)
BS (x)	*48c* (x)	
46 (s)	*48l* (x)	
g (x)	*48f* (m)	
gm (s)	*3n* (s)	
34 (s)	*49g* (s)	
	3 (s)	
	y4 (x)	

The phenotypes of heterozygotes compounded with two independent *lz* mutants of Classes I and II in general fulfill expectation based on allelism. Accordingly, the phenotype of the heterozygote is usually intermediate although in a few cases, it may be closer to one or the other mutant.

However, the two mutants of the Class III phenotype which are themselves phenotypically indistinguishable manifest a complementary interaction when compounded with all mutants of Classes I and II. The eye phenotype of these heterozygotes represents only a slight departure from wild-type, and the genitalia and tarsal claw phenotypes are inseparable from wild-type. On the basis of the heterozygotes phenotype, the Class III mutants would not be readily classified as *lz* alleles.

3. Crossing-over tests

The conclusion that the lozenge locus is in reality composed of three closely linked loci came from the observation that recombination occurs between the mutants *BS*, *46* and *g* (Green and Green 1949). On the basis of the distribution of marker genes in the recombination classes, it was concluded that *46* represents the middle locus with *BS* on the left and *g* on the right. Accordingly the precise genotypes of the three mutants can be designated as *BS* + +, + *46* + and + + *g*. These three mutants were used as testers to which other *lz* mutants were crossed and tested for recombination. The recessive mutants singed-3 (sn^{3}) bristles and cut-6 (ct^{6}) wings, 6.7 and 7.7 units respectively to the left of *lz*, and raspberry-4

(*ras*^{4}) eye color and/or vermilion (*v*) eye color, 5.1 and 5.3 units respectively to the right of *lz*, were used as markers (Bridges and Brehme 1944).

The general scheme for testing the allelic relations of any *lz* mutant is outlined in table 2. If it is assumed that the *lz* pseudoallelic system is delimited to three loci, then any *lz* mutant independent in origin of *BS*, *46* and *g*, designated *x*, can genotypically be either $x + +$, $+ x +$ or $+ + x$. The recombination tests should establish the precise genotype. In practice all mutants were first crossed to the tester *sn*^{3} *BS v*. If no recombinants were obtained, it was assumed that *x* was allelic to *BS*. This was confirmed by crossing *x* to *sn*^{3} *46 ras*^{4} *v*. Recombinants should be obtained and the markers distributed as indicated in cross 2a of table 2. The possibility must be entertained that some *lz* mutants might be localized to

Table 2. *Tester crosses designed to establish allelic relations of lz mutants (see text for description)*

Genotype ♀♀	Expected Recombinants
1. a. *sn*^{3} *BS* + + *v*/*x* + +	= no recombinants
b. *sn*^{3} *BS* + + *v*/+ *x* +	= + + + *v* and *sn*^{3} *BS x* +
c. *sn*^{3} *BS* + + *v*/+ + *x*	= + + + *v* and *sn*^{3} *BS* + *x*
2. a. *sn*^{3} + *46* + *ras*^{4} *v*/*x* + +	= *sn*^{3} + + + and *x 46* + *ras*^{4} *v*
b. *sn*^{3} + 46 + *ras*^{4} *v*/+ *x* +	= no recombinants
c. *sn*^{3} + *46* + *ras*^{4} *v*/+ + *x*	= + + + *ras*^{4} *v* and *sn*^{3} + *46 x*
3. a. *ct*^{6} + + *g v*/+ *x* +	= *ct*^{6} + + + and + *x g v*
b. *ct*^{6} + + *g v*/+ + *x*	= no recombinants

Crosses 1a and 2a establish allelism to *BS*,
Crosses 1b, 2b and 3a establish allelism to 46,
Crosses 1c, 2c and 3b establish allelism to *g*.

the left of *BS*. If this is the case then recombinants derived from the tester *sn*^{3} *BS v* would be *sn*^{3} + and *x BS v*. No evidence supporting this contingency was uncovered.

If recombination was obtained with *BS*, additional tests were made using the testers *sn*^{3} *46 ras*^{4} *v* and *ct*^{6} *g v*. As noted in table 2, if *x* is allelic to *46* then recombination should be obtained with *g* (3a, table 2), but not with *46* (2b, table 2), but if *x* is allelic to *g*, recombination should be obtained with *46* (2c, table 2) but not with *g* (3b, table 2).

As demonstrated in our earlier report dealing with the mutants *BS*, *46* and *g*, recombination between the mutants is a single crossover event resulting in reciprocal crossover products of (a) *lz*$^+$, inseparable from wild-type and (b) two *lz* mutants coupled to the same X chromosome (or double mutant class) and manifesting an eye and leg phenotype characteristic of the Class II mutants and designated as *s-like*. Because of this latter phenotypic consequence, only *lz*$^+$ recombinants were detected in recombination tests involving Class II mutants. Presumably, the double mutant class is phenotypically indistinguishable from the Class II mutant itself and thereby cannot be readily identified. In all other cases where Class I or Class III mutants were tested, both crossover products were, in general, recovered. The double mutant class was in all cases *s-like* in phenotype. In practice this crossover class was sought only in ♂♂, although phenotypically it could be scored in ♀♀ as well. However, proof of the recovery of

the double mutant class depends upon progeny testing of the individual involved. Since the breeding behavior of individual homozygous *lz* mutant ♀♀ is erratic, with many being sterile (Oliver & Green 1944), the scoring of the double mutant class in ♀♀ was abandoned. Accordingly in the data to follow the recovery of lz^+ individuals is based on both ♂ and ♀ progeny while the double mutant class on ♂ progeny only. Thus the lz^+ individuals are expected to be twice the number of double mutant types recovered.

The results obtained after testing fifteen (15) independent *lz* mutants with *BS* are listed in table 3. It may be noted that ten mutants failed and five gave recombination with *BS*. On the basis of the distribution of the marker genes between the recombination classes, it can be concluded that the latter five mutants are localized to the right of *BS*. No evidence was obtained which suggests that any of the mutants are located to the left of *BS*.

Table 3. *Crossing over tests with the BS tester (cross ♀♀ $sn^3 lz^{BS}$ v/lz^x X ♂♂ $sn^3 lz^{BS}$ v)*

Mutant tested = lz^x	Recombination Classes		Total F_1
	$lz^+ v$	sn^3 lz^{BS} lz^x	
s			5,112
36			6,845
48c			7,518
48l			12,162
3n			11,632
49g			12,575
34			10,474
37			22,136
50e (1)	a, b		16,889
50e (2)			59,440
50e (3)			63,115
49h			5,826
48f	1		2,710
gm	4		9,806
1	2	2	8,607
y4	12	6	14,235
3	7		8,706

a) 1♂ sn^3 lz^+ *v* recovered.

b) The mutant *50e* was tested with 3 mutants: (1) represents test with *BS*, (2) with *34* and (3) with *3n*.

All mutants were tested further for recombination with *46*. The objectives of these tests were twofold. First, will the mutants which failed to recombine with *BS*, recombine with *46*? If so, will the distribution of the marker genes localize these mutants as alleles of *BS*? Second, will all mutants which recombined with *BS*, recombine with *46*, or will some fail to recombine? The results of the tester crosses made with *46* are listed in table 4. Without exception the ten mutants which failed to recombine with *BS* all recombined with *46*; moreover, the distribution of the marker genes between the recombinants demonstrates that all mutants are localized to the left of *46* and therefore are presumed to be allelic to *BS*.

The foregoing conclusion relative to the mutant *37* is based on the recovery of a single *s-like* recombinant among the progeny of the test with *46*. No attempt was made in these tests with *37* to detect lz^+ recombinants since *37* itself frequently overlaps wild-type in phenotype. The conclusion that *37* and *BS* are allelic was substantiated by further tests with the *s-like* recombinant. The recombinant should have the genotype of *37 46* +. Accordingly, among the ♂ progeny of ♀♀ + *s-like* v/sn^3 + +, two exceptional types should be found: ♂♂ *37* and ♂♂ sn^3 lz^{46} *v*. This conclusion was verified by the recovery of 2 *37* ♂♂ and 3 sn^3 *46 v* ♂♂ among 7,000 ♂♂ derived from heterozygous ♀♀ as noted.

As indicated in table 4, the five mutants which recombined with *BS* fall into two classes. Three mutants (*1*, *gm*, *48f*) failed to produce recombinants whereas two (*3* and y^4) gave recombinants with *46*. Moreover, in the case of *3* and y^4 the distribution of the marker genes between the recombinants localizes these

mutants to the right of *46*. Thus it can be concluded that the mutants *1*, *gm* and *48f* are alleles of *46* while *3* and y^4 are alleles of *g*.

This conclusion was validated following tests for recombination of the five mutants with the *g* tester. The results are summarized in table 5. As anticipated,

Table 4. *Crossing over tests with the 46 tester (Cross = ♀♀ sn^3 lz^{46} ras^4 v/lz^x X ♂♂ sn^3 lz^{46} ras^4 v)*

Mutant tested = lz^x	Recombination Classes				Total F_1
	sn^3 lz^+	lz^x lz^{46} ras^4 v	lz^+ v	sn^3 lz^{46} lz^x	
s	2				6,552
36	5				5,537
48c	4				12,009
48l	4				13,973
3n	3				7,254
49g	8				14,106
34	11[b]	4			23,020
37	[a]	1			8,644
50e	2	3			5,550
49h	1	1			5,197
48f	c				6,829
gm					11,014
1					6,049
y4			6[d]		21,515
3			3		11,807

a) No attempt to score this class since *37* overlaps +
b) In addition 1 ♀ sn^3 lz^+ v recovered which on progeny testing produced ♂♂ sn^3 lz^+ ras^4 v and sn^3 lz^{46} ras^4 v
c) One ♂ sn^3 lz^+ ras^4 v recovered
d) One lz^+ ♀ recovered which on progeny testing produced ♂♂ sn^3 lz^{46} ras^4 v and ♂♂ lz^+.

the mutants *1*, *gm* and *48f* all recombine with *g* and the marker genes associated with the recombinants indicates that all are localized to the left of *g*, while the mutants *3* and y^4 failed to recombine. Thus the aforementioned conclusions bearing on the allelic relations of these mutants are supported by the tests with *g*.

Table 5. *Crossing over tests with the g tester (Cross = ♀♀ ct^6 lz^g v/lz^x X ♂♂ ct^6 lz^g v)*

Mutant tested = lz^x	Recombination Classes		Total F_1
	ct^6 lz^+	lz^x lz^g v	
48f	1		5,737
gm	2		7,285
1	4		7,529
y4			12,530
3			8,917

In addition to recovering a number of double mutant combinations, the synthesis of a "triple mutant", i. e. an X chromosome carrying *BS*, *46* and *g* concurrently was accomplished. To carry out this synthesis, advantage was taken of the fact that the phenotype of individuals homozygous + *46 g v* have an eye color whose red eye pigment is reduced. Often the pigment reduction is not as great as, for example, in the mutant *s* where the red eye pigment is confined to a narrow marginal rim. It was assumed, therefore, that the triple mutant might be discriminated from the double mutant by virtue of a greater reduction in red eye pigment. Among the 4.140 ♂ progeny of ♀ of the genotype sn^3 *BS* + + v/+ *46 g v*, three exceptions were found. Two ♂♂ were + *v* and 1 ♂ sn^3 *v* had an eye phenotype equivalent to that of *s* in which the red eye pigment was reduced to a faint marginal rim. It was presumed that this

♂ was genotypically *sn*^{3} *BS 46 g v*. That this conclusion is correct was demonstrated as follows. Females heterozygous for a wild-type X chromosome and the presumed triple mutant with marker genes as noted above were obtained. The demonstration of the triple mutant genotype follows if among the progeny of the heterozygous ♀♀, ♂♂ genotypically *sn*^{3} *BS v* and *g v* occur. Among 3,995 ♂ progeny of heterozygous ♀♀, the following exceptional ♂♂ were recovered: 2 ♂♂ *sn*^{3} *BS v*, 2 ♂♂ *g v*, 1♂ *46 g v*. Thus the occurence of the triple mutant is established.

The recombination tests demonstrate that the eighteen independent *lz* mutants are distributed among three loci. In addition to using the mutants *BS*, *46*, and *g*, a number of recombination tests were made using the mutant *36*. Although this mutant is phenotypically readily separable from *BS* (see table 1), the recombination tests indicate that *36* and *BS* are alleles. Mutants tested to *36* included *37*, *48c*, *34*, *gm*, *1*, *4*, *y*^{4} and *g*. A listing of the precise numerical results is unnecessary since in detail they are in complete agreement with the results obtained when each mutant was tested to *BS*. The number of progeny scored for each test to *36* ranged from 7,500—14,000. The mutants *37*, *48c* and *34* all failed to recombine with *36* just as with *BS*, while all other mutants gave *lz*$^+$ recombinants whose associated marker genes demonstrated that all are localized to the right of *36*. Taken together these results as well as the findings tabulated in tables 3, 4 and 5 support the conclusion noted above that each *lz* mutant can be assigned to only one of three loci. A consideration of the phenotypes concomitant to allelic mutants demonstrates that class I and class II mutants are found at each locus while the two class III mutants are allelic to *BS*.

Table 6. *Allelic relation of 18 lozenge mutants based upon recombination*

Locus		
spe	*lz*	*gly*
1	*1*	*1*
BS	*46*	*y4*
36	*48f*	*3*
48c	*gm*	
48l		
3n		
49g		
34		
37		
50e		
49h		

In view of these considerations it seems appropriate to redesignate the three loci so that their map location will be apparent. The name lozenge (symbol *lz*) is retained for the middle locus. All mutants allelic to *lz* retain their original designation. The locus to the left of *lz* is herein designated as spectacle (symbol *spe*) and all mutants allelic to *spe* retain their original superscript designation except *lz*^{s} which now becomes *spe*^{1}. The locus to the right of *lz* is named glossy (symbol *gly*) and all mutants allelic to *gly* retain their superscript designation except *lz*^{g} which now becomes *gly*^{1}. The distribution of the individual mutants to the there loci is summarized in table 6. The three loci collectively will be referred to as the *lz* pseudoallelic array.

The computation of the map distances separating the three loci has been derived from the frequency of wild-type recombinants since the double mutant class could not be readily scored in all cases. The wild-type recombinants are taken to represent one-half the crossovers between loci, and the crossing over percentage was computed in the usual manner after doubling the frequency of the wild-type class. In computing the map distance for the interval *spe-lz*, thirteen separate crosses listed in tables 3 and 4 as well as data reported previously

(Green and Green 1949) were used. From these crosses 56 wild-type recombinants were found among 134,865 individuals giving a crossing over percentage of 0.083%. For the interval *lz-gly* six crosses derived from tables 4 and 5 and our earlier report were used. Twenty wild-type recombinants were scored among 69,971 progeny, equal to a crossing over percentage of 0.057%. The sum of the crossover percentages for the two intervals, 0.140%, represents crossing over for the interval *spe-gly*. This last figure has been verified from data collected in recombination tests involving *spe* and *gly* mutants. Eleven separate crosses were made involving these mutants of which only two are listed in table 3 and one was reported previously. The unlisted crosses need not be noted in detail except to point out that they all involve *spe* mutants (*spe*, spe^{36}, spe^{48c}, spe^{48c}, spe^{3n}, etc.) tested to *gly*. From the eleven crosses 70 wild-type recombinants among 98,399 progeny were found. This represents a crossing over percentage of 0.142% which agrees remarkably well with the linkage intensity based on the sum of intervals *spe-lz* plus *lz-gly*.

Included among the results listed in tables 3 and 4 are four instances in which the recovery of lz^+ individuals occurred in the absence of crossing over. In two cases, viz. tests of *50e* with *BS* and *48f* with *46* these were the only lz^+ individuals recovered. Since there is added information that in both instances the mutants tested are truly allelic, it seems reasonable to conclude that the lz^+ individuals occurred as a consequence of reverse mutation. In one instance *BS* reverted, in the second *46* reverted to wild-type. The other occurrences of lz^+ occurred in crosses involving pseudoalleles. Accordingly two interpretations are possible: (1) reverse mutation and (2) double crossing over. An explanation of double crossing over requires that it would occur in an interval of the total genetic length of about six units where, purportedly in Drosophila, interference is complete. It should be pointed out that no cases of double crossing over have been observed in the tests reported here in the *sn-v* interval, a distance of about 10 units. This fact suggests that double crossing over is probably not involved and the lz^+ individuals arose by reverse mutation of *46* in one case and y^4 in the other.

4. The allelic relationship of almondex

On the basis of linkage map location and a superficial phenotypic resemblance, it has been suggested (Gottschewski 1936, Bridges and Brehme 1944, Ponte-corvo 1955) that the recessive mutant almondex (*amx*) is a member of the *lz* pseudoallelic array despite the fact that the heterozygote of *amx* and any *lz* pseudoallele is wild-type in phenotype. There are, however, compelling reasons based on recombination as well as comparative phenotypes which argue against any allelic relations between *amx* and the *lz* pseudoalleles.

The analysis of crossing over between *amx* and *lz* pseudoalleles is difficult because of the vagaries of the *amx* phenotype. At best the eyes of *amx* individuals are smaller than wild-type with disarranged facets giving a "rough" appearance, but most *amx* individuals are indistinguishable from wild-type. Nonetheless crossing over between *amx* and *lz* mutants has been detected. Novitski (1949) got one sn^3 amx^+ lz^+ ♂ among 2,728 ♂♂ derived from ♀♀ of the genotype *amx*/sn^3 *46 ras v* indicating that *amx* is localized to the left of *46*. In support of this observation in our tests 1 ♂ *amx g v f* occurred among 1,211 ♂ progeny of ♀♀

amx/ct^{6} *g v f*. Attempts to recover the reciprocal crossover were abandoned because too many *amx* ♂♂ were indistinguishable from wild-type. From ♀♀ of the genotype *amx g v f/sn*^{3} *BS v*, two classes of exceptional ♂ progeny were recovered: 1 ♂ *sn*^{3} *BS g v f* and 4 ♂♂ *amx v*. Inadvertently the total number of ♂♂ was not recorded. This observation suggests that probably *amx* is localized to the left of the *spe* locus.

The comparative phenotypes of *amx* and *lz* mutants militate for the interpretation that these mutants are not functionally similar and therefore should not be grouped into the same pseudoallelic array. It has been pointed out that ♀ infertility in *lz* pseudoalleles is associated with absence of specific accessory genitalia (Oliver and Green 1944, Anderson 1945) whereas in *amx* ♀♀ these accessory genitalia are normal. Similarly the abnormal tarsal claw phenotype characteristic of most *lz* pseudoalleles finds no parallel in *amx* individuals whose claws are normal. Finally, the phenotype of the double mutant, *amx g*, is clearly different from that of all double mutants recovered involving *lz* pseudoalleles. As noted previously, double mutants involving two pseudoalleles each of intermediate phenotype, manifest a phenotype approaching that of the mutant *spe* and are clearly more extreme than either single mutant itself. This interaction of coupled pseudoalleles occurs even in the case of the double mutant *37 46* where *37* by itself is often inseparable from wild-type. The double mutant, *amx g*, fails to manifest the interaction phenotype characteristic of the pseudoalleles. Instead the phenotype appears to be a composite of the individual mutant phenotypes. Thus the eyes are somewhat reduced in size, a characteristic of *amx*, but in pigmentation and in facet arrangement the eyes are inseparable from *g*. The tarsal claws are inseparable from those of *g*. Heterozygous ♀♀ of the genotype *amx/amx g* are inseparable from *amx/amx* while ♀♀ *amx/+ g* are inseparable from *g*. Taken together, these facts demonstrate that *amx* is unrelated to the mutants of the *lz* pseudoallelic array and should not be included as part of the array.

5. Cytological localization of the *lz* pseudoalleles

That a cytological analysis of the *lz* pseudoalleles could be made, was predicated on the assumption that chromosome rearrangements, especially deficiencies associated with the pseudoalleles could be induced. Two observations supported this assumption. Demerec and Sutton (1942) found that an x-ray induced deficiency for tan body color, t^{282-18}, which extends cytologically from salivary gland H chromosome bands 8C3 to 8C13–14 and possibly 8C15–17, also includes the *amx* and *lz* loci. The cytogenetic analysis of the x-ray induced cut wing mutant, ct^{268-29} analyzed by Hoover (see Bridges and Brehme, 1944) showed that this ♂ lethal mutant possessed, in addition, a *lz* phenotypic effect causally associated with an X–III translocation. The X chromosome break was localized between bands 8D8 and 8D9 while the break in IIIR occurred in the chromocenter region. One additional rearrangement has been associated with the sections 8C and 8D, viz. the inversion, *In(1)AM*. This inversion has a left break between 8C17 and 8D1 and a right break at 16E2–3.

The first experiments designed to detect *lz* rearrangements were carried out by treating wild-type ♂♂ with an x-ray dose of 4,000 R and mating to *ClB/sn*^{3}*g v* ♀♀. Rearrangements were sought among the non-*ClB* ♀♀ in the form of

sn$^+$ *g v*$^+$ ♀♀. These experiments were disappointing. While a number of putative *lz* deficiencies were found as *sn*$^+$ *g v*$^+$ ♀♀, on progeny testing all ♀♀ were sterile. This approach was abandoned. However, when the ♀ fertile mutants *50e* and *49h* became available, rearrangements were again sought. It was found that ♀♀ heterozygous for t^{282-18} and either *50e* or *49h* manifested the phenotype of the *lz* mutants and were fertile. Since earlier tests had shown that ♀♀ heterozygous for t^{282-18} showed pseudodominance for *lz* mutants at any of the three loci, e. g. *BS*, *46* and *g*, it was obvious that rearrangements involving *lz* could be detected in ♀♀ heterozygous for *50e* or *49h*. The experiments noted earlier were repeated as follows: wild-type ♂♂ were treated with 4,000 R of x-rays and crossed to

Table 7. *Cytological analysis of chromosome rearrangements associated with the lz pseudoalleles*

Nature of Rearrangement	Cytological Findings
t^{282-18}	deficient for 8C3 to 8C13–14
df(1) lz-1	deficient for 7F1 to 8E1
df(1) lz-2	deficient for 8D1 to 8E3 may include 8C15–17
df(1) lz-3	deficient for 8C2–3 to 8E1–2
df(1) lz-5	deficient for 8D4–5 to 9A
In(1) lz-1	left break in 8D before 8E1–2, right break after 20D
In(1) lz-2	inseparable from *In(1) lz-1*
In(1) lz-3	left break boefore 4E1–2, right break after 8E1–2
In(1) lz-4	left break after 8A1–2, right break before 8E1–2
In(1) lz-5	left break before 8E1–2, right break after 18F1–2
In(1) lz-6	left break before 8E1–2, right break after 9B11–12
In(1) lz-7	inseparable from *In(1) lz-1*
T(1–2) lz	X break before 8E1–2, IIL break at 33A–B

♀♀ *sn*^{3} *50e v*. The F_1 ♀♀ were scored for deficiencies. Five separate experiments were completed in which a total of about 150,000 F_1 ♀♀ were examined. A total of 17 ♀ phenotypically *50e* were found of which five were fertile. Each of the fertile ♀♀ behaved identically when test crossed to *sn*^{3} *50e v* ♂♂ in that their ♀ progeny were phenotypically either *sn*^{3} *50e v* or *50e* and their ♂ progeny consisted solely of *sn*^{3} *50e v*. Thus the irradiated X chromosome not only permitted pseudodominance of *50e* but was also ♂ lethal suggesting that a deficiency including the *50e* locus had been induced in each case. Each of the presumptive deficiencies was incorporated into a balanced lethal stock with the combination *y Hw In(1) dl 49 m*^{2} *g*^{4} serving as the balancer chromosome. Each deficiency was tested further for pseudodominance with *amx*, *BS*, *46*, *g* and other *lz* mutants. The genetic tests were identical in all cases. Each deficiency permitted pseudodominance of *amx* as well as *lz* mutants belonging to each of the three loci. A cytological analysis was completed on four of the deficiencies and confirmed that each was deficient for a section of the X chromosome although the specific limits of the deficiencies differed in each case. A summary of the cytological analyses is found in table 7. On the basis of these observations the *lz* mutants can be tentatively assigned to section 8D of the X chromosome. This section is not particularly favorable for cytological analysis since the bands stain rather faintly making precise determination of break points difficult. For this reason it seems reasonable to suggest that the t^{282-18} deficiency is probably longer than as described.

A second group of rearrangements associated with the *lz* locus was found among the progeny of X-rayed ♂♂ crosssed to *sn*^{3} *50e v* ♀♀. It was observed that an appreciable number of F_1 ♀♀ manifested "rough" eye phenotype caused by disarrangement of the facets and resembling in many cases the phenotype of the mutant *spe*[37]. Progeny tests of a number of the "rough" eye ♀♀ showed that in at least eight cases their phenotype was associated with a change at the *lz* locus. Thus each "rough" eyed ♀ when test crossed to *sn*^{3} *50e v* ♂♂ produced the following classes of progeny: ♀♀ *sn*^{3} *50e v* and "rough" eyed, ♂♂ *sn*^{3} *50e v* and *spe-like*. The ♂♂ designated *spe-like* were phenotypically inseparable from *spe* manifesting the reduced eye size, fused facets and tarsal claw vestiges characteristic of this mutant. The *spe-like* ♂♂ were rather weak and maintained in cultures with difficulty. Therefore these mutants were also incorporated into balanced lethal stocks as noted earlier. Genetic tests in the form of the determination of crossing over between the *sn* and *v* loci made with the *spe-like* mutants showed that each reduced crossing over in this interval suggesting that all the mutants were associated with a chromosome aberration. Cytological analyses confirmed this and demonstrated further that seven mutants were associated with X chromosome inversions and the eighth with a translocation between the X and IIL. In table 7 the cytological determination for each rearrangement is given. Since specific determinations in section 8D were difficult, the breaks in this region were listed as just before or after the doublet 8E1-2. What is significant, however, is the fact that in each case one break is proximal to the 8D region. It seems reasonable to conclude from these data that the *spe-like* phenotype common to all eight arrangements is causally associated with the break in the 8D section. It ist not clear whether mutation has occurred or that the *spe-like* phenotype is a variegated position effect of the type commonly found in Drosophila associated with breaks proximal to the white and brown loci. While a number of the *lz* rearrangements are associated with breaks in the heterochromatic regions about the centromere, other rearrangements are not obviously broken in the heterochromatin. The possibility does exist that the latter may be associated with intercalary heterochromatin and therefore all the rearrangements are position effects. It is noteworthy to point out that *In(1)AM* associated with a left break between 8C17–8D1 manifests none of the phenotypic characteristics associated with the rearrangements described here. Tests made with *In(1)AM* to *50e*, *amx* and a sample of *lz* mutants of each of the three loci showed that the heterozygotes in all cases are wild-type. Moreover dissections of *In(1)AM* ♀♀ showed that their sterility is not of the *lz* type since their accessory genitalia were normal. Finally *In(1)AM/amx* ♀♀ are fertile. These facts taken together suggest that the lozenge mutants are localized in section 8D of the X chromosome, a region of faint banding without obvious doublets and unfavorable for more detailed analysis.

Discussion

The foregoing analysis of recombination among 18 independent lozenge mutants has established the following facts. Each mutant can be assigned to one of the three loci. Spontaneous and x-ray induced mutants occur at each locus. Within the limitations of the recombination analysis, no obvious differences were detected between the spontaneous and induced mutants.

The absence, especially among the x-ray induced mutants, of instances where more than one locus mutated simultaneously is significant and merits further examination. Among possible interpretations for this failure, the following are suggestive. Each locus, linearly defined along the chromosome within limits measured by crossing over, is mutationally independent of the other loci. In this view, the concurrent mutation of two loci would occur at a rate equal to the product of their individual mutation rates. Presumably the mutation rates at each locus are so low such that double mutants are rare. Alternatively, it may be reasoned that the loci are mutationally interdependent such that the occurrence of a mutation at one locus precludes mutation at a second locus. The following experiments were designed to test the alternative suggestions. An attempt was made to induce with x-irradiation a *lz* mutant in a chromosome already carrying an x-ray induced *lz* mutant. In practice, ♂♂ carrying one of the mutants *BS*, *46*, or *g* as well as the markers sn^3 and *v* were irradiated with x-rays at dosages ranging from 3,000–4,500 R and crossed to attached-X ♀♀. The ♂ progeny were scored and *spe-like* individuals were sought. The *spe-like* individuals can arise in one of three ways: (1) the allele irradiated mutates to a phenotypically *spe-type* without further alteration at the locus, (2) a *lz* mutant is induced at an independent locus resulting in a double mutant type, (3) a *lz* rearrangement of the type described earlier occurs producing the concomitant *spe-like* phenotype. The three modes of origin can be distinguished as follows. In the case of (1) the recombination relations of the *spe*-type should be identical to that of the allele irradiated. From a *spe-like* arising by mechanism (2), by recombination the allele irradiated and the induced mutant should be isolated separately. The *spe-types* derived by mechanism (3) can be tentatively identified by their phenotypic effects when tested to either *50e* or *49h* and confirmed by cytological analysis.

Among a total of 50,239 ♂♂ progeny derived from irradiated ♂♂, 13 *spe-like* ♂♂ were found. Of the total, 8 were sterile and 5 fertile. The fertile ♂♂ fell into two types. Four ♂♂ were associated with a chromosome rearrangement involving the *lz* region. In one ♂ derived from an irradiation of sn^3 *BS v*, mutation at an independent locus occurred. This was demonstrated by testing for recombination in ♀♀ heterozygous for the *spe-like* and a wild-type chromosome with the following results. Among 5,369 progeny, 3 sn^3 *BS* ♂♂ and 4 ♂♂ with a *lz* phenotype more extreme than *BS* but not *spe-like* and carrying the *v* marker were found. Thus by irradiation, a new mutant was induced at a locus to the right of *BS* without altering *BS*. This observation demonstrates that mutation at one locus does not preclude mutation at other loci.

It will be noted further that the recombination analysis of the several *lz* mutants reported herein failed to uncover any loci in addition to the three described previously (GREEN and GREEN 1949). This observation, taken at face value, is at variance with the observations of BENZER (1955) in bacteriophage DEMEREC *et al.* (1955) in *Salmonella* and PRITCHARD (1955) in *Aspergillus*. These investigators concluded from studies of recombination among a number of independent "allelic" mutants in each organism that no two mutants occupied the same locus. A number of reasons may be submitted to account for this apparent discrepancy. While it is conceded that exhaustive intralocus tests were not made, it is nevertheless reasonable to believe that the scope of these tests was

sufficient to exclude, as highly unlikely, the interpretation that the *lz* mutants are distributed as a continuous array between the tester mutant loci. A reexamination of tables 3 and 4 shows that among the ten mutants which failed to recombine with the *BS* tester all recombine with the *46* tester. A comparison of the several tests shows that their scope was of the same order of magnitude. From an hypothesis that the ten alleles of *BS* are continuously localized between *BS* and *46*, it would be anticipated that in terms of crossing over some alleles would be closer to *BS* than to *46*, others equidistant between the tester mutant loci and still others closer to *46* than to *BS*. Such a distribution would mean that the majority of the *BS* alleles are either equidistant between the testers or closer to the *46* mutant. It is especially difficult, in the case of the mutants so distributed, to understand why they can all recombine with *46* and fail to recombine with *BS*. Presumably it would be necessary to invoke chance alone to account for the failure to observe recombination with *BS*. The remote probability of this event demands the conclusion that the mutants are not, recombinationally speaking, continuously distributed, and failure to observe recombination supports the interpretation of allelism of the mutants.

Consistent with the interpretation of allelism, it is pertinent to point out that in the one case where on phenotypic grounds the existence of an additional locus could be presumed, extensive intralocus analyses were unsuccessful. This is the analysis of the mutants *50e* and *49h* which give a complementary phenotypic interaction when compounded with all other *lz* mutants considered herein. Since there are a number of instances where phenotypically similar mutants are very tightly linked yet manifest a complementary phenotypic interaction when compounded, it is not unreasonable to suspect that *50e* and *49h* occupy a locus separate from the three described. Among the numerous instances fulfilling this description (summarized by Komai 1950) the miniature and dusky wing mutants of Drosophila serve as a clear example (Komai and Takaku 1949; Slatis and Willermet 1954). Reference to table 3 shows that no recombinants were found when *50e* and *49h* were tested to *BS*. Furthermore, the recombinants recovered in the tests with *46* place both mutants at the *spe* locus. It can be argued that the *50e* and *49h* mutants represent a fourth locus despite the outcome of tests with *BS*. If the *50e* and *49h* mutants occupy loci to the left of *BS*, and if *BS*, an x-ray induced mutant, is associated with a small rearrangement, it is possible to explain the failure to recover recombinants with *BS*. Such a rearrangement associated with *BS* might involve the region just to the left of the *spe* locus. From this premise, it readily follows that chromosome pairing between the *spe* locus and the purported *50e* locus would be altered in a manner to preclude the recovery of single crossover products in tests with *BS* but not with *46*. Therefore in an attempt aimed to obviate this possibility, *50e* was extensively tested for recombination with the mutants *34* and *3n*, spontaneous alleles of *BS*, on the assumption that spontaneous mutants are less likely to be associated with minute rearrangements. The results of these tests, listed in table 3, are in complete agreement with observations made with *BS*. In the combined crosses involving over 120,000 progeny no recombinants were detected, thereby substantiating the original deduction that despite their complementary phenotypic interaction the *50e* and *49h* mutants are alleles at the *spe* locus and do not represent an additional locus.

Thus the conclusion can be made that at the same locus, defined in terms of recombination, two phenotypic classes of mutants occur: those manifesting the characteristic phenotypic criteria of allelism when crossed inter se and those manifesting a complementary phenotypic effect. These observations do not support the hypothesis suggested by Pontecorvo (1955) in which it is proposed that a spatial separation delineates mutants giving the two types of phenotypic effects — those close together fulfilling the phenotypic criteria of allelism, those somewhat farther apart manifesting complementary phenotypes.

It is significant to note that the intralocus results obtained with the *lz* mutants are in complete agreement with similar, although less extensive, crosses involving the pseudoalleles at the white (Mackendrick 1953) and forked loci (Green 1956). Experiments designed to detect crossing over between mutants presumed to be allelic by the recombination criterion were negative in both instances.

While the intralocus tests reported exclude the interpretation that the mutants are arrayed in a continuous fashion, they do not eliminate the possibility that the mutants assigned to a locus occupy discrete sites within the locus. According to this view, a locus is organized as a cluster of separate, contiguous sites, each of which is potentially mutable. Whether or not these mutational sites are separable by crossing over is an open question. Presumably, if the sites are linearly localized along the chromosome, recombination between them could occur. The intralocus tests made with the *50e* and *49h* mutants suggest that if this atomistic situation does in fact exist, then the recombination frequency between mutants in juxtaposition must be very low, perhaps of the order of magnitude of recombination detected in bacteriophage (Benzer 1954).

In his profound valedictory discussion of the gene, its nature and properties, Stadler (1955) has defined the gene as "the smallest segment of the gene-string that can be consistently shown to be associated with a specific genetic effect". It follows from this definition that until it is demonstrated that each of the *lz* loci described herein can be further subdivided, each locus represents a discrete gene.

The cytological analysis provides no aid in resolving the question of the number of loci associated with the *lz* pseudoalleles. As pointed out earlier, it is possible from the available *lz* rearrangements to localize the pseudoalleles in a general way to section 8D of the salivary gland X chromosome. This region is, unfortunately, unfavorable for a detailed analysis, and it is therefore not possible to associate the *lz* mutants with any specific bands or groups of bands.

Alternative interpretations of the relevance of pseudoallelism to the problem of the nature of the gene have been offered. On the one hand it has been reasoned that because of the differential phenotypes associated with the coupling versus repulsion linkages, pseudoalleles are components of a larger functional gene within which crossing over occurs. Conversely, it is opined that the pseudoalleles between which crossing over occurs are also functionally distinctive. It has been suggested that a determination of the number of recombinational sites has bearing on the significance of the contradictory interpretations (Pritchard 1955) with the finding of a multiplicity of sites militating against the common functional and recombination gene. Since the detailed analysis of the *lz* mutants shows that they are classifiable into but three loci, the model of the functional gene as being distinct from a recombinational gene is less likely than its alternative.

Summary

1. A cytogenetic analysis of 18 independent *lz* mutants is presented.

2. On a phenotypic basis the mutants can be separated into three classes.

3. The results of a recombination analysis show that each of the 18 mutants can be assigned to one of three loci. No case where a *lz* mutant involved more than one locus was found.

4. Both phenotypic and recombination evidence place the *amx* mutant outside the *lz* pseudoallelic system.

5. Cytologically the *lz* pseudoalleles have been localized to section 8D of the salivary X chromosome.

6. The relevance of the data presented to the nature of pseudoallelism is discussed.

Acknowledgements. We are deeply indebted to Dr. Aloha M. Hannah who supplied us with the detailed cytological analyses reported herein. In addition we are indebted to a number of our colleagues who provided counsel and facilities during the course of this study including Professors C. P. Oliver, A. H. Sturtevant, G. W. Beadle and Drs. M. Demerec, B. Mc Clintock and E. Novitski.

Literature

Anders, G.: Untersuchungen über das pleiotrope Manifestationsmuster der Mutante *lozenge-clawless* (*lz^{cl}*) von *Drosophila melanogaster*. Z. Vererbungslehre **87**, 113 (1955). — Andersen, R. C.: A study of the factors affecting fertility of lozenge females of *Drosophila melanogaster*. Genetics **30**, 280 (1945). — Benzer, S.: Fine structure of a genetic region in bacteriophage. Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. **41**, 344 (1955). — Bridges, C. B., and K. C. Brehme: The mutants of *Drosophila melanogaster*. Carnegie Inst. Publ. **1944**, 552. — Demerec, M., I. Bloomstrand and Z. E. Demerec: Evidence of complex loci in Salmonella. Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. **41**, 359 (1955). — Demerec, M., B. P. Kaufmann, U. Fano, E. Sutton and E. R. Sansome: The gene. Cargeegie Inst. Yrbk. **41**, 190 (1942). — Goldschmidt, R. B.: The theory of the gene. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. **16**, 1 (1951). — Theoretical Genetics, pp. 563. Berkeley and Los Angeles: University of California Press 1955. — Gottschewski, G.: Quantitative und qualitative Unterschiede innerhalb einer Allelenreihe bei *Drosophila melanogaster*. Zool. Anz. Suppl. **9**, 104 (1936). — Green, M. M.: Pseudoallelism and the gene concept. Amer. Naturalist **89**, 65 (1955). — A further analysis of the forked locus in *Drosophila melanogaster*. Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. **42**, 73 (1956). — Green, M. M., and K. C. Green: Crossing-over between alleles at the lozenge locus in *Drosophila melanogaster*. Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. **35**, 586 (1949). — Komai, T.: Semi-allelic genes. Amer. Naturalist **84**, 381 (1950). — Komai, T., and T. Takaku: A study of the closely linked genes minature and dusky in *Drosophila virilis*, with some considerations on allelism of genes. Cytologia (Tokyo) **14**, 87 (1949). — Lewis, E. B.: Pseudoallelism and gene evolution. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. **16**, 159 (1951). — Pseudoallelism and the gene concept. Caryologia (Pisa) **6**, Suppl., 100 (1954). — Some aspects of position pseudoallelism. Amer. Naturalist **89**, 73 (1955). — Mackendrick, M. E.: Further examples of crossing over between alleles of the w series. Drosophila Information Service **27**, 100 (1953). — Novitski, E.: Position of amx. Drosophila Information Service **23**, 65 (1949). — Oliver, C. P., and M. M. Green: Heterosis in compounds of lozenge alleles in *Drosophila melanogaster*. Genetics **29**, 331 (1944). — Pontecorvo, G.: The genitical formulation of gene structure and action. Adv. Enzymol. **13**, 121 (1952). — Genetical analysis of cell organization. Symposia Soc. Exper. Biol. **6**, 218 (1952). — Gene structure and action in relation to heterosis. Proc. Roy. Soc. Lond., Ser. B, **144**, 171 (1955). — Pritchard, R. H.: The linear arrangement of a series of alleles of *Aspergillus nidulans*. Heredity (Lond.) **9**, 343 (1955). — Slatis, H. M., and D. A. Willermet: The miniature complex in *Drosophila melanogaster*. Genetics **39**, 49 (1954). — Stadler, L. J.: The gene. Science (Lancaster, Pa.) **120**, 811 (1954). — Stephens, S. G.: Possible significance of duplication in evolution. Adv. Genet. **4**, 247 (1951). — Symposium on pseudoallelism and the theory of the gene. Summary, synthesis and critique. Amer. Naturalist **89**, 117 (1955).

Dr. M. M. Green, Department of Genetics, University of California, Davis, California, USA.

Zeitschrift für indukt. Abstammungs- und Vererbungslehre, Bd. 87, S. 722—734 (1956)

Aus dem Botanischen Institut der Universität Freiburg i. Br.

BASTARDIERUNGSVERSUCHE IN DER GATTUNG *STREPTOCARPUS LINDL.*

V. PHÄNOTYPISCHE UND GENOTYPISCHE GESCHLECHTSBESTIMMUNG BEI DEM BASTARD *STR. (WENDLANDII × REXII)**

Von

FRIEDRICH OEHLKERS

(Eingegangen am 21. August 1956)

A. Vorwort

Wenn ich nach nunmehr 13 Jahren wieder damit beginne, über genetische Versuche an *Streptocarpus* zu berichten, so ist es schon angezeigt, die lange Pause zu begründen. Sie war eine Kriegsfolge; denn im November des Jahres 1944 wurden alle unsere Gewächshäuser völlig zerstört und der gesamte Pflanzenbestand ging zugrunde. Erst 1950 konnten die Häuser endgültig wiederhergestellt und 1952 ein neues großes Versuchshaus gebaut werden. Die Zeit von 1944 –1950 bzw. 1949, als wir provisorisch begannen, geht weit über die Dauer der Keimfähigkeit aller *Streptocarpus*-Samen hinaus: meine alten Stämme waren verloren und es galt, neue zu erwerben. Aus den normalen botanischen Gärten war bis auf *Str. Rexii* und *Str. Wendlandii* kaum etwas zu holen. So blieb nur die „John Innes Horticultural Institution" in Bayfordbury mit ihrer umfassenden Sammlung von *Streptocarpus*-Arten. Dr. W. J. C. LAWRENCE bin ich zu größtem Dank verpflichtet; denn es sind allein 19 reine Arten, die ich von ihm aus seiner Abteilung erhielt, dazu noch von einer Art 5 verschiedene Standortsformen bzw. rein gezüchtete Genotypen. Nur durch diese Großzügigkeit wurde ich in Stand gesetzt, meine Arbeiten im gebotenen Umfang wieder aufzunehmen. Sodann bekam ich noch zwei neue Arten von Dr. BALLY direkt aus Kenia in Ostafrika und eine von Dr. BURTT aus Edinburgh. Es kommt hinzu, daß das Tempo der neuen Arbeit entscheidend durch den Bau des großen Versuchshauses durch die Regierung sowie einen Erweiterungsbau beeinflußt wurde, den die „Deutsche Forschungsgemeinschaft" aus Mitteln des Schwerpunktes für Genetik bereitstellte. Zugleich wurde ich von dorther mit Mitteln für wissenschaftliche Mitarbeiter sowie technisches Personal reich unterstützt. Besonders zu nennen ist meine langjährige Mitarbeiterin Fräulein UTE EBELL, deren Arbeitskraft auch angesichts der ständigen Ausdehnung der Kulturen nie erlahmte, sowie Herr Garteninspektor MACHATZKE, der alle gärtnerischen Voraussetzungen auf das Beste organisierte. Allen diesen Personen und Institutionen möchte ich meinen besonderen Dank vorweg abstatten. Ich hoffe durch die nun folgenden Publikationen zeigen zu können, daß die reichen Mittel nicht vergeblich aufgewendet worden sind.

B. Einleitung

In meiner ersten Arbeit über *Streptocarpus* (OEHLKERS 1938) hat sich ergeben, daß bei reziproken Kreuzungen zwischen *Streptocarpus Rexii* und *Str. Wendlandii* im Geschlechtsverhalten verschiedene Typen auftreten. Der Bastard *Str. (Rexii × Wendlandii)* zeigt eine leichte Vermännlichung insofern, als das Gynaeceum in seiner Funktionsfähigkeit etwas beeinträchtigt ist, und der Bastard *Str. (Wendlandii × Rexii)* ist verweiblicht: die Staubblätter fallen völlig aus und an ihrer Stelle entstehen Staminodien. Diese reziproke Verschiedenheit ist offenbar auf eine differente Reaktion monohybrid spaltender Gene in den verschiedenen Plasmen zurückzuführen: denn bei der Rückkreuzung mit dem Vater findet eine 1 : 1 Spaltung statt. Es treten im gleichen Verhältnis die F_1-Typen

* Professor Dr. MAX HARTMANN zum 80. Geburtstage gewidmet.

wieder auf und daneben solche, bei denen die oben angeführte Tendenz der F_1 extrem realisiert ist. Die Kreuzungs-Nachkommenschaft *Str.* [(*Wendlandii* × *Rexii*) × *Rexii*] ist die bedeutungsvollere von beiden; denn das Phänomen prägt sich hier deutlicher aus, so sei sie vorangestellt. Es gibt eine 1 : 1 Spaltung, die einerseits den F_1-Typus reproduziert und andererseits Formen hervorbringt, bei denen das Androeceum vollkommen verweiblicht ist. In allen Übergängen finden sich Staminodien apikal mit Narbenpapillen und basal mit Samenanlagen bis zu solchen, die als reale Fruchtknoten ausgebildet werden. Freilich sind diese „Nebenfruchtknoten" einseitig offen, da sie ja wie jedes Staubblatt aus einem einzigen Carpell bestehen, während die normalen Fruchtknoten zweiblättrig sind. In der reziproken Kreuzung gibt es bei Rückkreuzung mit dem väterlichen Elter eine analoge, doch nicht ganz so weitgehende Verschiebung nach der männlichen Seite; es findet sich eine Spaltung von 1 : 1 zwischen dem F_1-Typus und solchen Pflanzen, die ein gänzlich steriles Gynaeceum haben. Diese Versuche wurden nun nach dem Wiederbeginn mit dem neuen Material reproduziert, was bei den früher verwendeten normalen Kulturbedingungen vollkommen gelang. Bei andersartigen Kulturweisen indessen zeigte sich, daß der Bastard *Str.* (*Wendlandii* × *Rexii*) recht labil ist und mit seiner Geschlechtsreaktion relativ leicht auf äußere Bedingungen anspricht. Davon soll im folgenden die Rede sein.

C. Materialien

Für die vorliegende Arbeit wurden drei verschiedene Arten verwendet: *Streptocarpus Rexii*, *cyaneus* und *Wendlandii*. Die Herkünfte der einzelnen Formen werden nach den Botanischen Gärten bezeichnet, aus denen sie stammen bzw. nach den Personen, von denen ich sie bekam. Dabei ist zu bemerken, daß ich von einer sehr viel verwendeten Linie von *Str. Wendlandii* die Herkunft nicht mehr feststellen konnte und diese dann als *Str. Wendlandii* Freiburg bezeichnet habe. Die Abkürzung JIL bedeutet John Innes Horticultural Institution Abteilung Lawrence. Die von Lawrence als *Str. Rexii type* bezeichnete Form dürfte aller Beschreibung nach mit der ursprünglichen Art *Str. Rexii Lindley* identisch sein. Über das Methodische des experimentellen Verfahrens muß noch so vielfältig bei der Schilderung der Ergebnisse die Rede sein, daß es keinen Sinn hat, es hier zusammenzufassen. Die Kreuzungsbezeichnungen sind folgender Art: Als erstes steht die Nummer der beschriebenen Kreuzungen. Sie schließt sich an unsere letzte Arbeit an, in der wir Kreuzungsbeschreibungen aufführten (Oehlkers 1941). Sodann folgt das Kreuzungsjahr und die Kreuzungsnummer, und endlich die Kreuzung selbst.

D. Ergebnisse

1. Reproduktion der früheren Versuche

Nr. 66, 1952,4 *Str.* (*Rexii* Basel × *Wendlandii* München). Die Aussaat erfolgte 1952 im Juni, also unmittelbar nach der Samenreife; es wurden im ganzen 20 Pflanzen unter normalen Bedingungen aufgezogen. Es ist typisch für diese Bastarde ebenso wie für die reziproke Kreuzung, daß die Blattgröße vom 1. zu den späteren Blättern abnimmt. Diese Blüten hatten hier normale Antheren, wie das 1938 S. 329 Nr. 6 beschrieben worden ist. Die Fertilität des Fruchtknotens ist nicht ganz so normal wie die der reziproken Kreuzung.

Nr. 67, 1952, 3 *Str.* (*Wendlandii* München × *Rexii* Basel). Auch hier wurden zur gleichen Zeit wie bei der vorhergehenden Kreuzung 20 Pflanzen aufgezogen und unter normalen Bedingungen kultiviert, und es stellte sich in der Tat heraus, daß keinerlei Unterschiede gegenüber meinen 1938 angegebenen Versuchen besteht (vgl. Oehlkers 1938, S. 330, Nr. 8). Auch hier fehlen die Antheren in den im weiblichen Geschlecht völlig fertilen Blüten vollkommen, so daß lediglich fadenförmige Staminodien vorhanden sind. Alle übrigen Einzelheiten brauchen nicht weiter aufgeführt zu werden. — Ich füge hinzu, daß alle weiteren *Rexii* × *Wendlandii*-Kreuzungen mit allen verschiedenen Linien immer wieder dieselben Resultate gegeben haben, also nicht genauer aufgeführt zu werden brauchen.

2. *Die Abhängigkeit der Ausbildung des Androeceums von dem Lebensalter der Pflanzen*

Schon 1938 hatten wir darauf aufmerksam gemacht, daß die ersten Blüten, die bei der Kreuzung *Str. (Wendlandii × Rexii)* erscheinen, zu einer relativ stark weiblichen Ausbildung tendieren. Diese Verweiblichung der Blüten, die sich in der Rückkreuzung mit dem Vater bis zur Entstehung von Nebenfruchtknoten steigern kann, ist also offenbar abhängig vom Lebensalter. Wir haben auch diesen Befund zu reproduzieren versucht und führen hier den Bastard *Str. (Wendlandii × cyaneus)* an, der das besonders deutlich anzeigt.

Str. cyaneus JIL verhält sich in den Kreuzungen mit *Str. Wendlandii* genau so, wie *Str. Rexii*. Es ist ebenfalls eine rosulate Form mit freilich nicht so flach liegenden Blättern wie *Str. Rexii*, sondern etwas mehr hoch stehenden, so wie wir das 1938 für *Str. Rexii* Gartenform beschrieben haben. Mag sein, daß *Str. cyaneus* in dieses Gemisch mit eingegangen ist. Die Blüten haben rot gefärbte Zipfel, zeigen mangelhafte Fertilität bei Selbstbestäubung.

Nr. 68, 1951; 2 *Str. (Wendlandii × cyaneus)*. Im Februar 1952 wurden 59 Pflanzen unter normalen Bedingungen aufgezogen, die gleiche Geschlechtsverschiebung zeigten, wie das in der *Wendlandii-Rexii*-Kreuzung der Fall ist. Die Pflanzen kamen vom August ab zur Blüte und wurden dann auf den Zustand ihres Androeceums hin durchmustert. Dieser wird mit den Gruppenzahlen bezeichnet, so wie wir das 1938 S. 365 vorgeschlagen haben. Sie mögen hier noch einmal angeführt sein.

Vorweg sei noch bemerkt, daß die normale *Streptocarpus*-Blüte allein zwei ausgebildete Staubblätter besitzt. Die Orte der übrigen sind in der verwachsenkronblättrigen Blumenkrone entweder durch Staminodien oder allein nur noch durch Gefäßbündel gekennzeichnet. Die Antheren der beiden ausgebildeten — es sind die beiden abachsialen — vereinigen sich durch merkwürdig miteinander verschränkte Haare. Werden die Staubblätter nicht in voller Größe geformt, dann erreichen sich die Antheren nicht, die Ausbildung und Verschränkung der Haare unterbleibt (Gruppe 2 und 3). Von den entwicklungsgeschichtlichen Einzelheiten wird in weiteren Arbeiten die Rede sein.

Gruppe 1: Vollfertile vereinigte Antheren; Gruppe 2: getrennte Antheren; Gruppe 3: getrennte zu kleine Antheren; Gruppe 4: Staminodien mit leichten Erweiterungen; Gruppe 5: Staminodien ohne besonderen Charakter; Gruppe 6: Staminodien fehlen; Gruppe 7: Staminodien mit Narbenpapillen; Gruppe 8: Staminodien mit Narbenpapillen und Samenanlagen; Gruppe 9: Nebenfruchtknoten.

In Tabelle 1 sind die Resultate über die Antherenausbildung der *Wendlandii-cyaneus*-Kreuzung zusammengefaßt. Die Zahlen in der 2. Horizontalreihe bedeuten die Gruppenzahlen. Die vertikal darunterstehenden Zahlen geben die Anzahl der Blüten an, die in die einzelnen Gruppen einzuordnen sind. Wir sehen deutlich, daß bei Beginn der Blüte (August—September) das Maximum in Gruppe 8 liegt, wie das die bereits darunterstehende Prozentberechnung noch mehr hervorhebt. Bald verschiebt sich jedoch das Maximum nach Gruppe 3 und 4 hin, um dort dann bis zum Ende zu bleiben. Daß Gruppe 6 bei dieser Kreuzung stets ein Minimum darstellt, dürfte auf einer besonderen Manifestationseigentümlichkeit von *Str. cyaneus* beruhen: es fällt hier eben im Gegensatz zu der *Wendlandii-Rexii*-Kreuzung die Gruppe „Staminodien fehlen" aus oder ist kaum vorhanden[1]. So haben wir also eine deutliche Abhängigkeit der Ge-

[1] Man könnte natürlich im Zweifel sein, ob die Gruppe 6 „Staminodien fehlen" gerade an dieser Stelle der ganzen Übergangsreihe einzuordnen ist. Tatsächlich ergab sich das bereits aus meinen früheren Arbeiten; doch kommen wir in der hier vorliegenden noch einmal darauf zurück (vgl. S. 728).

Tabelle 1. *Nr.* 68, 1951,2. *Str. (Wendlandii × cyaneus)*

Zustand des Androeceums	Zahl der Blüten									Sa
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
7. 8. bis 29. 9.		1 0,3%	17 5,4%	24 7,6%	32 9,9%	11 3,5%	21 6,6%	162 51,0%	49 15,5%	317
6. 10. . . .			66 35,2%	70 37,4%	28 15,0%	1 0,5%	7 3,7%	12 6,4%	3 1,6%	187
13. 10. . . .		1 0,5%	127 53,0%	99 41,2%	13 5,4%					240
20. 10	1 0,5%		114 60,6%	67 35,6%	3 1,6%		2 1,1%	1 0,5%		188
27. 10. . . .	9 5%		59 33,0%	93 52,0%	16 9,0%			1 0,6%		178
3. 11. . . .		1 0,8%	43 32,8%	83 63,4%	4 3,0%					131
10. 11. und später . . .	2 2,3%		32 36,0%	47 53%	7 8,0%		1 1,1%			89
Summe	12	3	458 35,0%	483 36,2%	103 7,7%	12	31	176 13,2%	52	1330

schlechtsausbildung des Androeceums von dem Lebensalter zu konstatieren. Wir hielten es demnach für möglich, daß sich auch noch andere Beziehungen finden lassen würden.

3. Die Abhängigkeit der Geschlechtsausbildung des F_1-Bastards von der Temperatur

a) Vorversuche. Temperaturversuche waren das Nächstliegende und in der Zeit, in der wir sie begannen, auch allein technisch möglich.

Es wurde dazu wieder Nr. 67 erneut verwendet. 1953, 3 *Str. (Wendlandii* München × *Rexii* Basel). Die Aussaat erfolgte, wie schon gesagt, spät im Jahr, am 10. 6. 52, gleich nach der Samenernte. Die Keimlinge wuchsen recht langsam heran, wurden 3mal pikiert und Ende September getopft. Am 19. 10. 52 wurde diese F_1 in 3 Teile geteilt, wovon Teil A im Gewächshaus bei $+20^0$ C blieb, Teil B in eine Kältekammer mit $+10^0$ C und 16 Std Licht kam, und Teil C in eine andere Kältekammer mit ebenfalls $+10^0$ C aber nur 8 Std Licht je Tag (Lichtintensität 900—750 Lux). Die Versuchspflanzen waren noch recht unterschiedlich groß, die Blattlänge schwankte zwischen 1—9 cm. An diesen 3 Orten blieben die Pflanzen bis zum 13. 2. 53, also fast 4 Monate. Teil A beginnt zu diesem Zeitpunkt mit der Knospenbildung, die Blätter der Pflanzen sind gleichmäßig grün und die Blattlänge liegt zwischen 30 und 35 cm für das 1. Blatt. Dagegen sind die Pflanzen von Teil B und C im Wuchs zurückgeblieben; sie besitzen weniger Blätter je Rosette und eine Blattlänge von 4—17 cm. Die Basis der Blätter dieser Kältepflanzen ist dunkelgrün, das obere Drittel dagegen hellgrün. Die Pflanzen aus den Kältekammern wurden dann in einem kleinen Versuchshaus bei Temperaturen von $+10^0$ bis $+15^0$ C weiter kultiviert. Im Warmhaus entwickeln sich die Infloreszenzen sehr langsam und durchaus nicht gleichzeitig. Doch haben die Pflanzen dort meist 1 Blatt mehr als die in dem kühlen Versuchshaus. In letzterem werden die Infloreszenzen gleichmäßiger entwickelt.

Am 2. 5. 53 blühen von Teil A 60% der Pflanzen, in Teil B 66% und von Teil C 23%. Die Blüten wurden aufgeschlitzt und auf die Ausbildung der Antheren hin angesehen. Teil A (warm): Während in den ersten Blüten die Antheren fehlten oder nur als Staminodien entwickelt wurden, hatten später einzelne Blüten Staminodien mit Papillen oder Papillen und Samenanlagen. Teil B und C: Die Pflanzen zeigen in den ersten Blüten Staminodien, später vereinzelt Staminodien mit Erweiterungen und sogar zu kleine, getrennte Antheren.

Dieser Befund ließ eine Beeinflußbarkeit der Geschlechtsausprägung durch die Temperatur schon erkennen. Da er nicht von Anfang an quantitativ erfaßt worden war, beschlossen wir, ihn noch einmal mit voller Exaktheit zu wiederholen und haben dabei, wie weiter unten berichtet werden soll, neue Aufzuchten gleichzeitig mit verschiedenen anderen Linien von *Str. Wendlandii* und *Rexii* unternommen. Außerdem mußte natürlich die Frage gestellt werden, ob es sich dabei um eine nur phänotypische oder doch auch um eine den Genotypus betreffende Differenz handelt. Darum wurden extreme Typen von den Wärme- wie Kältepflanzen der Vorversuche mit *Str. Rexii* rückgekreuzt und später ebenfalls unter den verschiedensten Temperaturbedingungen aufgezogen.

b) Quantitative Bestimmung der Verschiebung in der Geschlechtsausprägung durch die Temperatur bei der Kreuzung *Str. (Wendlandii* × *Rexii)*. Es wurden dazu zunächst zwei neue Kreuzungen und eine von den alten aufgezogen. Nr. 69, 1952, 9 *Str. (Wendlandii* München × *Rexii type* JIL); Nr. 70, 1952, 1 *Str. (Wendlandii* Utrecht × *Rexii* Basel), und endlich wieder Nr. 67, 1952, 3 *Str. (Wendlandii* München × *Rexii* Basel). Wieder blieben als Teil A je 20 Pflanzen im Gewächshaus bei 20° und Teil B kam mit je 20 Pflanzen in eine Kältekammer mit + 10° C und 16 Std Licht. Doch begann diesmal die Behandlung im Juni, die Pflanzen sind ein wenig größer als im Jahr vorher. Blattlänge 5—10 cm, und die Lichtintensität in der Kältekammer betrug etwa 2000 Lux. Am 21. 10. kommt Teil B ins kleine Versuchshaus zurück, das möglichst kühl gehalten wird.

Teil A beginnt Ende Oktober zu blühen. Zur Beurteilung der Blüten wurden die Pflanzen einzeln bezeichnet und zunächst zu jeder beurteilten Blüte ihre Stellung an der Infloreszenz und deren Zugehörigkeit zum 1., 2. oder 3. Blatt notiert. Es zeigte sich, daß die Blüten vorwiegend Staminodien ohne besonderen Charakter enthielten, oft fehlten auch die Staminodien, nur selten fanden sich Staminodien mit Griffelpapillen oder sogar Samenanlagen. Am 27. und 28. 1. 54 wurden alle Pflanzen noch einmal auf den Blütenzustand hin angesehen. Dabei blieb die Lage der Blüten unberücksichtigt. Der Antherenzustand hatte sich nicht verändert. Die Pflanzen wurden zurückgeschnitten und von jeder Kombination nur 10 Pflanzen weiter aufgehoben. Bei einer Durchsicht im März und April 1954 ist der Antherenzustand in Teil A wiederum unverändert: Staminodien ohne besonderen Charakter.

Die Infloreszenzen der Pflanzen aus Teil B begannen sich Mitte Januar zu strecken; die Blüten wurden Mitte Mai von je 10 Pflanzen beurteilt. Während die ersten Blüten Staminodien ohne besonderen Charakter oder Staminodien mit leichten Erweiterungen enthielten, wurden die Blüten mit getrennten und zu kleinen Antheren später häufiger.

Da die in der Wärme aufgezogenen Pflanzen eine hinreichende Anzahl von Blüten produzierten, die Kältepflanzen naturgemäß sehr viel weniger, so wurde 1954 noch einmal eine Aufzucht unter Kältebedingungen durchgeführt und erst 1955 zum Abschluß gebracht. Dabei wurde hier wieder eine andere Linie von *Str. Wendlandii* verwendet, nämlich *Str. Wendlandii* Freiburg[1]. Von jeder der beiden Aufzuchten Nr. 71, 1953, 36 *Str.* (*Wendlandii* Freiburg × *Rexii* Basel) und Nr. 72, 1953, 38 *Str.* (*Wendlandii* Freiburg × *Rexii type* JIL) kamen im Juni 1954 10 Pflanzen in die Kältekammer unter denselben Bedingungen wie im Jahre vorher. Sie waren freilich etwas größer als die Pflanzen des Vorjahres, ihre Blattlängen betrugen 7—20 cm. Im Oktober kamen sie in das kalte Versuchshaus, wo sie den Winter hindurch bei 10 - 12° C blieben, und im Januar 1955 endlich in die kühlere Abteilung des großen Streptocarpus-Hauses (15—18° C) damit die inzwischen angelegten Infloreszenzen endlich zur Blüte kamen. Die Durchsicht der Blüten war am 10. März 1955 abgeschlossen.

Die Resultate dieser langwierigen Versuche sind in Tabelle 2 übersichtlich zusammengestellt. Das eindrucksvollste Ergebnis ist das einer klaren Übereinstimmung der in verschiedenen Zeiten und mit verschiedenen Materialien an-

[1] Es mag dabei darauf hingewiesen werden, daß die 3 Linien *Str. Wendlandii* München, Utrecht und Freiburg eingreifende Unterschiede in ihrem Vernalisationsverhalten zeigen (vgl. OEHLKERS 1956), doch nicht die geringsten in ihrem Geschlechtsverhalten, soweit es sich an den Kreuzungen mit *Str. Rexii* kenntlich macht.

Tabelle 2. *Zustand des Androeceums bei Wärme- (A) und Kälte- (B) Pflanzen des F_1-Bastards Str. (Wendlandii × Rexii)*

Zustand des Androeceums	Zahl der Blüten je Nachkommenschaft									Sa
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
(A) Nr. 69. 1952, 9 *Str. (Wendlandii*					365 74,5%	105 21,4%	8 1,6%	12 2,5%		490
(B) München × *Rexii type* JIL*)*			54 21%	118 46%	83 22,4%		1 0,6%			256
(A) Nr. 70. 1952, 1 *Str. (Wendlan-*					616 92,1%	47 7 %	4 0,6%	2 0,3%		669
(B) *dii* Utrecht × *Rexii Basel)*			19 32,1%	28 47,5%	11 18,7%	1 1,7%				59
(A) Nr. 67. 1952, 3 *Str. (Wendlan-*					335 93,8%	21 5,9%			1 0,3%	357
(B) *dii* München × *Rexii* Basel*)*			10 41,7%	8 33,3%	6 25%					24
(B) Nr. 71. 1953, 36 *Str. (Wendlan-dii* Freiburg × *Rexii* Basel*)*			57 24,4%	147 62,8%	30 12,8%					234
(B) Nr. 72. 1953, 38 *Str. (Wendlan-dii* Freiburg × *Rexii type* JIL*)*			67 30,4%	125 56,8%	28 12,7%					220
Summe A in %					1316 86,7%	173 11,3%	12 0,1%	14 0,1%	1 0,01%	1516
Summe B in %			207 26,5%	426 53,7%	158 19,8%	1 0,01%	1 0,01%			793

gestellten Experimente. Wir sehen, daß bei allen Wärmepflanzen (A) die Variation des Androeceums sozusagen schlagartig in Gruppe 5 im Hinblick auf die nach der männlichen Seite hin tendierenden Gruppen 4—1 aufhört und zugleich in dieser Gruppe 5 ein ungemein signifikantes Maximum von 86,7% vorhanden ist. Die übrige Variation geht ausschließlich nach der weiblichen Seite. Die Kältepflanzen hingegen teilen mit den Wärmepflanzen in ihrer Variation die Gruppe 5, doch allein als gering beschickte Schlußvariante. Ihr Maximum liegt ebenso klar und deutlich in Gruppe 4 mit 53,7% so überaus verschieden von dem der Wärmepflanzen, daß es keiner statistischen Berechnung zur Klärung weiter bedarf. Darüber hinaus ist die Gruppe 3 in allen Fällen noch mit hohen Prozentsätzen vertreten, im Ganzen mit 26,5%, während Gruppe 5 nur mit 19,8% auftritt. So ist also kein Zweifel: *Hohe Temperatur verschiebt die Manifestation des Geschlechts in unserem Bastard nach der weiblichen, tiefe Temperatur dagegen nach der männlichen Seite.*

Einige weniger wichtige Resultate seien kurz erörtert. Mit den oben abgeleiteten Versuchen findet auch ein Versuch aus unserer ersten Arbeit von 1938 seine Erklärung. Damals war auf S. 334/35 angegeben, daß F_1-Pflanzen, die überwintert worden sind, bei erneuter Blüte im nächsten Frühjahr leicht nach der männlichen Seite hin tendieren. In Abb. 17 b auf S. 335 ist eine Blüte mit zu kleinen und getrennten Antheren abgebildet. Wir hatten früher keine Gewächshäuser, die bei konstanter hoher Temperatur gehalten werden konnten, sondern überwinterten die Streptocarpuspflanzen in dem kleinen Gewächshaus — wir verwenden es heute für die hier geschilderten Versuche als kaltes Haus — das tags etwa 15°, nachts oftmals noch tiefere Temperaturen besitzt. Das alles stimmt also gut mit den hier gegebenen Befunden überein.

Die Pflanzen der Abt. A zeigen außerdem, daß die Seriierung „Staminodien ohne besonderen Charakter" (Gruppe 5), „Staminodien fehlen" (Gruppe 6), „Staminodien mit Griffelpapillen" (Gruppe 7) usf. die richtige ist. Gruppe 6 ordnet sich zwanglos bei den *Wendlandii-Rexii*-Kreuzungen in den Ausschlag nach der weiblichen Seite hin ein. Daraus ergibt sich nun, daß der zweifellos bei der Kreuzung *Str. (Wendlandii × cyaneus)* an dieser Stelle vorhandene Sprung eine für diesen Bastard gegebene Besonderheit darstellt.

4. Die Reaktionen der Rückkreuzungen Str. [(Wendlandii × Rexii) × Rexii] der Wärme- und Kältepflanzen auf verschiedene Temperaturen

Weiterhin ist es notwendig zu wissen, wie sich die Rückkreuzungen, also die Nachkommen der Wärme- und Kältepflanzen bei erneuter Temperaturbeeinflussung verhalten. Dabei ist freilich zu bedenken, daß es sich bei diesen Rückkreuzungen nunmehr um kein einheitliches Material mehr handelt, sondern daß darin eine 1 : 1 Spaltung zwischen solchen Pflanzen besteht, die der F_1 gleichen, und anderen, die eine stärkere Verweiblichung zeigen mit allen Übergängen bis zu den Nebenfruchtknoten hin. So ist es zulässig, allein nach Pflanzen und nicht anders nach Einzelblüten zu registrieren und dem Zustand der F_1 die stärker verweiblichten, also sozusagen die Homozygoten der *Rexii* Geschlechtsgene im *Wendlandii* Plasma, in unserer Tabelle 3 einander gegenüberzustellen. Wir sehen also in dieser Tabelle lediglich eine Beurteilung der einzelnen Pflanzen und zwar nach ihren 6 ersten Blüten.

Die Rückkreuzungen wurden von extremen Pflanzen der ersten Vorversuche gemacht; es sind das Nr. 73, 1954; 14 extreme Wärmepflanze *Str.* [*(Wendlandii* München × *Rexii* Basel*)* × *Rexii* Basel] und Nr. 74, 1954; 41 extreme Kältepflanze *Str.* [*(Wendlandii* München × *Rexii* Basel*)* × *Rexii* Basel]. Sie wurden gleich nach der Ernte im Oktober und November 1953 ausgesät und wuchsen dementsprechend nur langsam heran. Am 24. 3. 54 wurden die Nachkommenschaften in 3 Teile aufgeteilt. Teil A kommt in die Wärmeabteilung des großen Streptocarpus-Hauses, befindet sich also ständig in einer Temperatur etwas höher als 20° C. Teil B kommt in die kühlere Abteilung des großen Gewächshauses und ist einer gemäßigten Temperatur zwischen 15 und 18° C ausgesetzt. Teil C endlich kommt in die Kältekammer mit 10—12° C und 16stündiger Belichtung. Da die Pflanzen aus verschiedenen Aussaaten stammen, kommen sie nicht gleichzeitig in die Kältekammer, sondern immer erst dann, wenn sie ein wenig herangewachsen sind. In der Kältekammer selbst erreichen die Pflanzen ungefähr die gleiche Größe. Am 18. 10. wird Teil C aus der Kältekammer herausgenommen und kommt in das kleine Versuchshaus, das den Winter über kühl gehalten wird, so daß eine Temperatur zwischen 10 und höchstens 15° C dort herrscht. Durch die vorhergehende Behandlung in der Kältekammer beträgt die Blattlänge des noch grünen Stücks ungefähr 12—17 cm, die Breite 7 cm, die Mittelrippe ist oft rot, die Blätter zur Basis hin meist stark gewellt und sehr steif. Im Januar 1955 wird Teil C endlich in die kühle Abteilung des großen Streptocarpus-Hauses gebracht, damit die Pflanzen auch zur Blüte kommen. Aus dem vorhergehenden geht schon hervor, daß es für den Effekt allein notwendig ist, daß die Infloreszenzen bereits angelegt werden. Die Resultate werden in Tabelle 3 zusammengefaßt.

Will man die Befunde in Tabelle 3 erläutern, so ist zunächst darauf hinzuweisen, daß eine klare 1 : 1 Spaltung am deutlichsten erkennbar wird bei der Behandlung von Nr. 73 in gemäßigter Temperatur. Hier finden sich 52 : 48%, also eine so gute Übereinstimmung mit dem Verhältnis von 1 : 1, wie das überhaupt nur erwartet werden kann bei der nicht sehr großen Anzahl von Pflanzen, nämlich 39 : 36. Es sind das also die Nachkommen einer Wärmepflanze vom vorhergehenden Jahr, jetzt in gemäßigter Temperatur gehalten. Die übrigen Resultate erkennen wir klarer, wenn wir die *P*-Werte ins Auge fassen und als erstes die Behandlungsart betrachten, die die Pflanzen unabhängig von ihrer Herkunft im

Tabelle 3. *Die Rückkreuzungen Nr.* 73, 1954, 14 *extreme Wärmepflanze Str.* [*(Wendlandii München* × *Rexii Basel)* × *Rexii Basel*] *in ihren Temperaturreaktionen*

Gruppe A: Wärmepflanzen, Gruppe B: mäßig warm gehaltene Pflanzen, Gruppe C: Kältepflanzen. Es wurden in dieser Tabelle nicht die einzelnen Blüten beurteilt, sondern die typische 1:1 Spaltung dieser Rückkreuzung unterschieden, also zwei Klassen von *Pflanzen:* solche, die der normalen F_1 gleichen, daher in ihren Blüten *niemals Nebenfruchtknoten* zeigen und zum anderen solche, die die genisch bedingte stärkere Verweiblichung zeigen und demnach *Nebenfruchtknoten* besitzen.

Rückkreuzung und Behandlungsart	Zustand der Pflanzen: Blüten ohne Nebenfruchtknoten	Zustand der Pflanzen: Blüten mit Nebenfruchtknoten	Anzahl der Pflanzen	Verhältnis in %
Nr. 73, 1954; 14 (A)	39	27	66	59:41
Nr. 74, 1954; 41 (A)	29	43	72	40:60
Summe der Behandlungsart (A)	68	70	138	49:51
Nr. 73, 1954; 14 (B)	39	36	75	52:48
Nr. 74, 1954; 41 (B)	27	40	67	40:60
Summe der Behandlungsart (B)	66	76	142	46:54
Nr. 73, 1954; 14 (C)	50	11	61	82:18
Nr. 74, 1954; 41 (C)	55	32	87	66:34
Summe der Behandlungsart (C)	105	43	148	74:26

Jahre 1954/55 (vgl. Tabelle 4) erfuhren. Dabei findet sich zwischen den Behandlungsgruppen A und B keinerlei Differenz, d. h. es ist gleichgültig, ob die Pflanzen ständig einer Temperatur über 20° C ausgesetzt sind oder nur eine gemäßigte Temperatur von 15—18° C erhielten. In beiden Fällen kommt dasselbe Resultat

Tabelle 4. *Vergleiche. Homogenitätstest*

Behandlungsart 1954/55		
Test für Gruppe A und B	Keine Differenz homogen	$P = 0{,}64$
Test für Gruppe A, B und C	Gesicherte Differenz inhomogen	$P = < 10^{-5} > 10^{-6}$
Behandlungsart 1953/54		
Test für 1954; 14 und 1954; 41	Gesicherte Differenz inhomogen	$P = 0{,}0029$

zustande. Von diesen beiden Behandlungsweisen weichen die Kältepflanzen entschieden ab; es ist hier auch statistisch eine entscheidend gesicherte Differenz vorhanden. Dabei findet sich dieselbe Tendenz wie im Jahr vorher bei der Behandlung der F_1. Die Kältepflanzen zeigen Anreicherung in der Kategorie „Pflanzen mit Blüten ohne Nebenfruchtknoten" und eine Verarmung in derjenigen, die die „Pflanzen mit Blüten mit Nebenfruchtknoten" enthielt. Auch hier wird also durch die Kältebehandlung wieder die Vermännlichung gefördert. In diesem Sinne stimmen die Versuche mit der F_1 und der Rückkreuzung durchaus überein.

Von besonderer Bedeutung scheint uns nun die letzte Spalte in Tabelle 4 zu sein, nämlich der Vergleich der Behandlungsarten der F_1 aus dem Jahre 1953/54

in ihren Nachkommen. Einmal zeigt der P-Wert für χ^2, daß eine gesicherte Differenz zwischen den beiden Behandlungsarten der Eltern vorhanden ist; das allein ist schon auffällig. Wenn wir nun aber die Tabelle 3 genauer betrachten und die einzelnen Klassen miteinander vergleichen, dann zeigt sich klar und deutlich, daß überall dort, wo es sich um Pflanzen handelt, deren Eltern einer Kältebehandlung ausgesetzt waren, also jeweils die Nr. 74, 1953; 41, daß dann die Klasse der stärker verweiblichten Pflanzen gegenüber denen der nach der männlichen Richtung hin verschobenen stärker gefördert ist. Es braucht nicht immer dazu zu führen, daß das Verhältnis der beiden Kategorien von 1 : 1 in dem Sinne verschoben wird, daß mehr überweibliche Pflanzen vorhanden sind, sondern bei der Kältebehandlung der Rückkreuzungen kommt es nur dazu, daß die extreme

Tabelle 5. *Rückkreuzungen 1954/55, wie in Tabelle 3*

Antherenzustand	Zahl der Blüten							Sa
	3	4	5	6	7	8	9	
Nr. 73, 1954; 14 A ohne Nebenfruchtknoten			4 1,7%	227 97%	2 0,9%	1 0,4%		234
mit Nebenfruchtknoten				107 66%			55	162 34%
			4 1%	334 84,3%	2 0,6%	1 0,2%	55 13,9%	396
Nr. 74, 1954; 41 A ohne Nebenfruchtknoten			2 1%	172 99%				174
mit Nebenfruchtknoten			4 1,5%	149 58%	2 0,7%	2 0,7%	100 39%	257
			6 1,4%	321 74,5%	2 0,5%	2 0,5%	100 23,2%	431
Nr. 73, 1954; 14 B ohne Nebenfruchtknoten			4 1,7%	221 95,5%	5 2,2%	1 0,4%		231
mit Nebenfruchtknoten			3 1,4%	114 54%	3 1,4%		91 43,2%	211
			7 1,6%	335 75,8%	8 1,8%	1 0,2%	91 20,6%	442
Nr. 73, 1954; 41 B ohne Nebenfruchtknoten			2 1,2%	151 93,2%	6 3,7%	3 1,9%		162
mit Nebenfruchtknoten				155 64,6%	1 0,4%		84 35%	240
			2 0,5%	306 76,1%	7 1,7%	3 0,8%	84 20,9%	402
Nr. 73, 1954; 14 C ohne Nebenfruchtknoten			81 27%	196 65,3%	14 4,7%	9 3%		300
mit Nebenfruchtknoten				38 57,6%		2 3%	26 39,4%	66
			81 22,1%	234 64%	14 3,8%	11 3,0%	26 7,1%	366
Nr. 74, 1954; 41 C ohne Nebenfruchtknoten			111 34%	205 62%	5 2%	9 3%		330
mit Nebenfruchtknoten			9 5,1%	96 51%	13 7%	10 5%	63 33%	190
			120 23%	301 57,8%	18 3,4%	19 3,6%	63 12,2%	520

Tendenz zur Vermännlichung (82 : 18%), wie sie sich bei Nachkommen der Wärmepflanzen zeigt (Nr. 73, 1954; 14 C), bei den Nachkommen der Kältepflanzen (Nr. 74, 1954; 41 C) auf 66 : 34% herabgesetzt ist. Es ist also in allen 3 Fällen verschiedener Behandlungsweise der Rückkreuzungen bei den Nachkommen der Kältepflanzen des Jahres vorher, die ihrerseits stärker vermännlicht waren, eine stärkere Tendenz nach der weiblichen Seite zu konstatieren (Tabelle 4 zeigte, daß statistische Sicherung besteht). In diesem Befund dürfte eines der entscheidendsten Resultate dieser Arbeit zu erblicken sein.

Wir haben nun noch Tabelle 5 zu betrachten. In dieser ist der Antherenzustand der einzelnen Blüten aller Rückkreuzungsnachkommenschaften nun in ihrer Variation vollständig eingetragen in analoger Weise, wie das in Tabelle 2 geschehen ist. Wir haben freilich hier wieder die einzelnen Reihen nach solchen Pflanzen trennen müssen, die entweder nie Nebenfruchtknoten besitzen sowie solchen, die Nebenfruchtknoten zeigen. Ein bißchen auffällig und nicht ganz verständlich ist die Tatsache, daß bei denjenigen Pflanzen, die Nebenfruchtknoten besitzen, stets 2 Maxima vorkommen, in Gruppe 6 und 9. Klarer verhalten sich diejenigen Pflanzen, die keinerlei Nebenfruchtknoten besitzen. Sie haben ihr Maximum entweder in Gruppe 6 oder 5, meistens in der Gruppe 6. Besonders bemerkenswert erscheint uns aber einmal, daß Gruppe 5 auch bei denjenigen Pflanzen, die als Rückkreuzungen kältebehandelt wurden, keineswegs das Maximum darstellt, sondern Gruppe 6, und ferener, daß die Zustände der Klassen 3 und 4 überhaupt nicht mehr vorkommen. Schließlich ist noch auffällig, daß die der F_1 ähnlichen Typen (Pflanzen ohne Nebenfruchtknoten) wohl in der Kälte die Gruppe 5 stärker ausfüllen als in der Wärme, daß aber die verweiblichten Pflanzen nicht viel weniger Blüten mit Nebenfruchtknoten ausprägen als in der Wärme. Das sei nur noch als Ergänzung der vorhergehenden Befunde angeführt und damit wenden wir uns der Diskussion der Ergebnisse zu.

E. Diskussion der Ergebnisse

1. Phänotypische Geschlechtsbestimmung

Es läßt sich an diesen Resultaten erweisen, daß bestimmte Einflüsse eine phänotypische Geschlechtsbestimmung sowohl des F_1-Bastards *Str. (Wendlandii × Rexii)* als auch dessen Nachkommenschaft bzw. Rückkreuzung *Str. [(Wendlandii × Rexii) × Rexii]* herbeiführen können. Es stellt sich heraus — besonders klar an dem Bastard *Str. (Wendlandii × cyaneus)* nachgewiesen —, daß mit dem Alter eine Tendenz zur Vermännlichung eintritt, und außerdem, daß die Temperatur einen nachdrücklichen Einfluß auf die Geschlechtsrealisation besitzt. Hohe Temperatur befördert die weibliche Ausbildung der Pflanzen, die ohnehin bei dem *Wendlandii-Rexii*-Bastard bzw. seiner Rückkreuzung mit dem väterlichen Elter bis zur Ausbildung von Nebenfruchtknoten an Stelle des Androeceums gehen kann. Tiefe Temperatur erreicht das Gegenteil, nämlich eine Vermännlichung der Blüten, die mindestens bei dem F_1-Bastard bis zur Ausbildung eines Androeceums mit Staubblättern mit getrennten und zu kleinen Antheren gehen kann.

Die Abhängigkeit der Geschlechtsausbildung vom Pflanzenalter ist bekannt. Als Beispiel sei auf Correns' Versuche verwiesen, in denen bei geschlechtslabilen Pflanzen (gynomonoecischen, gynodioecischen) ebenfalls eine

Abhängigkeit der Geschlechtsausbildung von dem Lebensalter der Pflanzen festgestellt wird, wenn auch keineswegs immer in demselben Sinn wie in unseren Versuchen. Auch andere Beispiele sind dafür bekannt geworden[1]. Die Abhängigkeit von der Temperatur könnte natürlich bis zu einem gewissen Grade dem parallel gehen, wenigstens in der freien Natur. Wenn Herbstblüten bei kühleren Nächten und einer Senkung der Gesamttemperatur eine Veränderung der Geschlechtsausbildung zeigen, so könnte das durchaus mit unseren Versuchen übereinstimmen. Diese Abhängigkeit vom Lebensalter ist indessen in unseren Versuchen bei dem Bastard *Str. (Wendlandii × cyaneus)* nicht so aufzufassen; die Pflanzen wurden bei konstanter Temperatur kultiviert und waren auch im November, als die letzten Registrierungen erfolgten, den gleichen Temperaturen ausgesetzt, wie in früheren Monaten. Es wäre natürlich dabei noch an eine Abhängigkeit von der Lichtperiode zu denken; doch hat sich dafür bisher bei *Streptocarpus* keinerlei Anhaltspunkte ergeben. Soweit die phänotypische Geschlechtsbestimmung.

2. Genotypische Geschlechtsbestimmung

Wir haben schon bei der Erörterung unserer ersten Arbeit über *Streptocarpus* (1938) ausgeführt, daß es sich bei dem eigentümlichen Phänomen der reziproken Verschiebung der Geschlechter um eine genotypische Geschlechtsbestimmung handelt, die indessen hier nicht allein von den Genen im Kern gesteuert wird, sondern auch von dem Plasmon. Wir haben uns nun darüber zu orientieren, in welcher Weise in diesem Rahmen unsere Versuche vom Jahr 1954/55 mit ihrer deutlich erkennbaren Veränderung des Gesamtgenotypus einzuordnen sind. Daß durch die Kälteeinwirkung Mutationen im Kern ausgelöst werden und diese sich dann anschließend so gleichmäßig bei allen Nachkommenschaftspflanzen auswirken können, ist absolut ausgeschlossen. Also muß es sich allein um eine Veränderung des Plasmons handeln. Eine solche könnte man sich in zweierlei Hinsicht denken. Einmal könnte man voraussetzen, daß man es in einem F_1-Bastard durchaus nicht mit einem einheitlichen Plasmon zu tun hat, daß also in unserem Fall nicht allein das *Wendlandii*-Plasmon vorhanden ist, sondern daß durch den Pollenschlauch eine nicht kontrollierbare Menge des *Rexii*-Plasmas und damit auch des *Rexii*-Plasmons hindurchgeht. Weiterhin wäre es denkbar, daß dieses Mischplasmon sich aussondert, in den verschiedenen Temperaturen verschieden. Es könnte sich also das *Wendlandii*-Plasmon als Gesamtheit in eben diesem Gemisch in der Kälte stärker durchsetzen als das *Rexii*-Plasmon. Nun läßt sich freilich zeigen, daß die eben entwickelte Vorstellung nicht zutreffen kann. Verschiedene Versuchsergebnisse sprechen dagegen. Einmal die Tatsache, daß durch

[1] Genauere Übereinstimmung scheint bei einigen Exemplaren des *Digitalis*-Bastards *D. (lutea × purpurea)* zu bestehen, der von HEILBRONN und NEBAHAT YAKAR (1942) untersucht wurde. Hier sind die Staubblätter der ersten Blüten völlig in Fruchtblätter umgewandelt, während die der späteren neben Samenanlagen auch noch Antheren tragen. Leider war mir diese Arbeit im Original nicht zugänglich; ich kann mich also nur auf SCHWERDTFEGER (1954) beziehen, die ähnliche Befunde bei *Digitalis lanata* machte und in diesem Zusammenhang die oben erwähnte Arbeit diskutiert. Dabei ist es freilich ein ziemlich starkes Stück, daß meine *Streptocarpus*-Arbeiten, die von 1938 an ein Verständnis der Geschlechtsbestimmung von Zwitterpflanzen anzubahnen versuchen und im speziellen auch noch das Phänomen der Verweiblichung des Androeceums zum Gegenstand haben, weder diskutiert noch überhaupt erwähnt werden.

ständige Rückkreuzung mit dem väterlichen Elter kaum eine Veränderung des plasmonischen Einflusses gefunden wird. Wir haben zwar gewisse Anhaltspunkte dafür, daß zwar in einigen Fällen, aber immer nur in einigen, Plasma durch den Pollenschlauch hindurchgeht und auf diese Weise einzelne Rückkreuzungslinien verschieben kann, aber jedenfalls kann man dafür niemals einen gleichmäßigen Betrag in Rechnung stellen. Das müßte man aber, wenn man annehmen wollte, daß ein gleichmäßiges Mischplasma in einer F_1 wie wir fanden, einseitig aber gleichmäßig verschoben wird. Dagegen spricht ferner noch ein anderer Befund, den wir in unserer nächsten Arbeit noch genauer belegen werden. Es gibt nämlich abgesehen von der Geschlechtsausprägung noch ein anderes Merkmal, das in der Rückkreuzung *Str. [(Wendlandii × Rexii) × Rexii]* auftritt und plasmonisch gesteuert wird, das ist die Blütenschlitzung. Diese Blütenschlitzung aber ist gänzlich unabhängig von der Temperatureinwirkung, und das bedeutet, daß keinesfalls das *Wendlandii*-Plasmon als Ganzes sich durch die Kälteeinwirkung verändert haben kann.

Es bleibt demnach nur noch eine andere Möglichkeit übrig: wir müssen annehmen, daß nicht das Gesamtplasmon durch die Kältebehandlung verändert ist, sondern daß eine *positive Selektion allein derjenigen Plasmoneinheiten stattgefunden hat, die aus dem Wendlandii-Plasmon stammen und sich auf die Geschlechtsrealisation beziehen.* Daß etwas derartiges möglich ist, dafür gibt es schließlich den Modellfall in den *Paramaecium*untersuchungen von Sonneborn und seinen Mitarbeitern. Sie haben feststellen können, daß durch Temperatureinwirkung die Vermehrungsrate des $\varkappa$-Faktors und die Teilungsrate der *Paramaecien* so verschiedenartig beeinflußt wird, daß schließlich erhebliche Differenzen zustande kommen können. Freilich darf man diesen Modellfall nicht als Beweis ansehen, denn bei einem $\varkappa$-Faktor handelt es sich ja bekanntlich um eine Art Virus. So bleibt unsere Interpretation vorläufig eine Hypothese, die es nun zu beweisen gilt. Sie läßt sich beweisen, allerdings in einem sehr langwierigen Versuch, den wir bereits angesetzt haben. Bei einer Kältebehandlung von *Str. Wendlandii* selbst müßte ebenfalls eine solche Anreicherung des plasmonischen Elementes, das sich auf die Geschlechtsrealisation bezieht, zustande kommen, so daß bereits in der daraus gewonnenen F_1 eine stärkere Verweiblichung erscheinen müßte. Sollte sich diese Annahme in etwa 3 Jahren als zutreffend erweisen — so lange werden die Versuche dauern, daran ist betrüblicherweise nichts zu ändern — dann würde die hier gegebene Interpretation unserer Versuche als bewiesen gelten müssen.

Kurz sei noch einmal die Frage gestreift, warum — wie aus Tabelle 5 hervorgeht — eine Gesamtverschiebung in der Rückkreuzung, unabhängig von der Temperatureinwirkung ebenfalls nach der weiblichen Seite erfolgt ist. Anders kann man es nicht gut auffassen, daß die Klassen 3 und 4 überhaupt nicht mehr beschickt werden, eben auch nicht von den Wärmepflanzen. Leider muß ich diese Frage offen lassen, weil ich vorläufig noch keine Antwort darauf sehe.

Auch der zweite aus Tabelle 5 hervorgehende Befund, der nämlich, daß die verweiblichten Typen in der Kälte nicht viel weniger Blüten mit Nebenfruchtknoten ausbilden als in der Wärme, ist schwer zu interpretieren. Wir können dazu vorläufig allein sagen, daß anscheinend mit stärkerer weiblicher Differenzierung die Stabilität des Phänomens gegen Umwelteinflüsse zunimmt. Damit

wird gleichzeitig deutlich, daß die von uns aufgestellten Typenklassen durch jeweils gleitende Übergänge miteinander verbunden sind.

Wir haben die Tabelle 5 in aller Ausführlichkeit mitgeteilt, obwohl ihr Inhalt kaum zu verstehen ist. Uns liegt daran, darauf aufmerksam zu machen, wie schwierig die Probleme werden in dem Augenblick, in dem die plasmonische Vererbung im Spiele ist. Es wird die höchste Zeit, daß die Genetiker mehr und immer mehr Objekte aufsuchen, die für die Bearbeitung unserer Fragen günstig sind. Allein durch größeren Einsatz hat man Aussicht, weiterzukommen, anstatt daß die wenigen Paradepferde immer wieder aufs neue vorgeführt werden.

Zusammenfassung

1. Bei den Bastarden zwischen *Str. Wendlandii* und der *Rexii*-Gruppe, wozu auch *Str. cyaneus* gehört, findet sich eine phänotypische Geschlechtsbestimmung, die sich mit dem Lebensalter ändert. Bei zunehmendem Alter rückt die Geschlechtsausprägung nach der männlichen Seite.

2. Auf die Geschlechtsausbildung des Bastards *Str. (Wendlandii* × *Rexii)* hat die Temperatur einen entscheidenden Einfluß. Bei hoher Temperatur um 20° C wird die weibliche Ausprägung des Bastards gefördert, bei tiefen Temperaturen zwischen 10 und 15° C wird die männliche Ausbildung gefördert. Dieselbe phänotypische Geschlechtsbestimmung findet sich auch in der Rückkreuzung mit dem väterlichen Elter von extremen Wärme- und Kältepflanzen.

3. Abgesehen davon findet sich bei diesen Rückkreuzungen nun noch ein besonderes Phänomen. Die Nachkommen der Kältepflanzen, die ihrerseits vermännlicht waren, zeigen nunmehr einen starken Ausschlag nach der weiblichen Seite, weit über die Nachkommen der Wärmepflanzen hinaus. Eine Interpretation dieser Versuche ist angeschlossen.

4. Auf die Schwierigkeiten bei der Interpretation einiger Befunde wird hingewiesen.

Literatur

Correns, C.: Experimentelle Untersuchungen über die Gynodioecie. Ber. dtsch. bot. Ges. **22**, 506—517 (1904). — Weitere Untersuchungen über die Gynodioecie. Ber. dtsch. bot. Ges. **23**, 452—463 (1905). — Die Vererbung der Geschlechtsformen bei den gynodioecischen Pflanzen. Ber. dtsch. bot. Ges. **24**, 459—474 (1906). — Hartmann, M.: Die Sexualität, 2. Aufl. Stuttgart: Gustav Fischer 1955. — Heilbronn, A., u. Nebahat Yakar: Gynodioecie und Intersexualität als Folge der Bastardierung zwittriger Species. Rev. Fac. Sci. Univ. Istanbul **7**, 4 (1942). — Oehlkers, F.: Bastardierungsversuche in der Gattung *Streptocarpus* Lindl. I. Plasmatische Vererbung und die Geschlechtsbestimmung von Zwitterpflanzen. Z. Bot. **32**, 305—393 (1938). — Bastardierungsversuche in der Gattung *Streptocarpus* Lindl. IV. Weitere Untersuchungen über Plasmavererbung und Geschlechtsbestimmung. Z. Bot. **37**, 158—182 (1941). — Neue Überlegungen zum Problem der außerkaryotischen Vererbung. Z. Vererbungslehre **84**, 213—250 (1952). — Veränderungen in der Blühbereitschaft vernalisierter Cotyledonen von *Streptocarpus*, kenntlich gemacht durch Blattstecklinge. Z. Naturforsch. **11b**, 471—480 (1956). — Schwerdtfeger, G.: Abweichungen im Blütenbau bei *Digitalis lanata*. Ber. dtsch. bot. Ges. **67**, 248—252 (1954). — Sonneborn, T. M.: Recent advances in the genetics of *Paramecium* and *Euplotes*. Adv. Genet. **1**, 264 bis 358 (1947). — Beyond the genes. Amer. Scientist **37**, 33—59 (1949). — Methods in the general biology and genetics of *Paramecium aurelia*. J. of Exper. Zool. **113**, 87—148 (1950). Beyond the genes — two years later. Sci. in Progr., VII. Ser. **1951**.

Prof. Dr. Friedrich Oehlkers, Botanisches Institut der Universität, Freiburg i. Br., Schänzlestr. 9

Zeitschrift für indukt. Abstammungs- und Vererbungslehre, Bd. 87, S. 735–742 (1956)

Institute of Genetics of the State University Utrecht, Netherlands

STUDIES ON THE MUTAGENIC ACTION OF FORMALDEHYDE IN *DROSOPHILA*

I. THE EFFECT OF PRETREATMENT WITH CYANIDE ON THE MUTAGENICITY OF FORMALDEHYDE AND OF FORMALDEHYDE-HYDROGEN PEROXIDE MIXTURES IN MALES

By

F. H. Sobels and J. W. I. M. Simons

With 3 figures in the text

(Eingegangen am 2. Juli 1956)

Auerbach (1952) found that aqueous solutions of formaldehyde if injected into adult *Drosophila* produce mutations, the majority of which trace back to mature sperm. Mutations in mature sperm were likewise obtained by Herskowitz (1953, 1955) after application of formaldehyde by his sperm bath method. According to observations of Sobels (1954a) an earlier stage of spermatogenesis also possesses sensitivity to the mutagenic action of injected formaldehyde.

In contrast to these effects on adults, formaldehyde, if added to the food of *Drosophila* larvae produces only mutations in an immature stage of spermatogenesis, presumably the auxocyte stage (Auerbach and Moser, 1953). Auerbach (1953) has considered the possibility that formaldehyde may exert its mutagenic action in two different ways: formaldehyde food by interfering with synthetic processes of growth stages, injected formaldehyde in a more direct manner, comparable to its action on *Neurospora* spores, as observed by Jensen *et al.* (1951). According to these authors the formation of organic peroxides may be involved in the mutagenic action of formaldehyde. They confirmed the observation of Dickey *et al.* (1949) that a mixture of formaldehyde and hydrogen peroxide is a much stronger mutagen for *Neurospora* conidia than either substance alone. If injected into *Drosophila*, however, such a mixture does not produce more mutations than a corresponding concentration of formaldehyde (Sobels, 1954). The hydrogen peroxide, if brought into contact with the interior of an adult *Drosophila* is decomposed immediately, so that a high catalase content in the body fluids of the fly has been assumed.

Dickey *et al.* (l. c.) suggested that dihydroxydimethyl peroxide, an organic peroxide that can be formed by the reaction of formaldehyde with hydrogen peroxide, is the active mutagenic substance in the formaldehyde-hydrogen peroxide mixtures in *Neurospora*. Injected into flies, dihydroxydimethyl peroxide acts as a fairly potent mutagen, indicating that the formation of an organic peroxide is possibly involved in the production of mutations by formaldehyde in *Drosophila* (Sobels 1954b, 1956).

This hypothesis has been subjected to further test by studying the effects of catalase inhibition on the mutagenic action of formaldehyde and of mixtures of formaldehyde and hydrogen peroxide. Preliminary experiments indicated that

the mutagenic efficacy of formaldehyde is increased after the injection of potassium cyanide. For technical reasons the injection of potassium cyanide had to be replaced by treatment with cyanide gas which was followed by injection of formaldehyde or of the mixture. The results of these experiments are reported below.

Material and methods

The apparatus used for exposing the flies to cyanide gas is shown in Fig. 1. First of all, taps 1 and 2 were closed. The gas was produced by introducing sulphuric acid through a separation funnel (*A*) into a flask (*B*) containing 30—50 ml of a 0.05 per cent solution of potassium cyanide. A mixture of air and cyanide

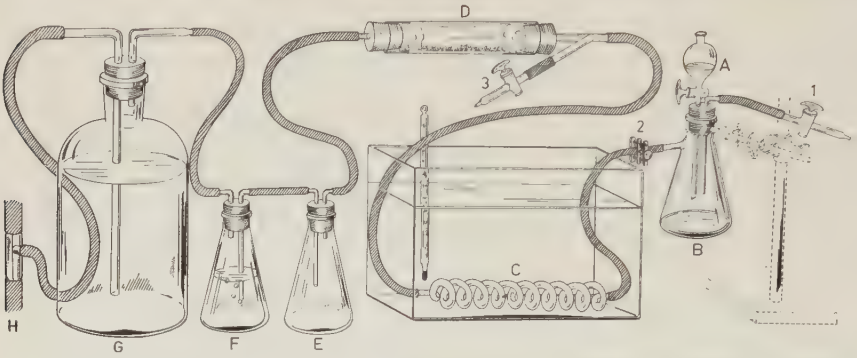


Fig. 1. The apparatus used for exposing the flies to cyanide gas; a detailed explanation is given in the text

gas was then sucked at a constant rate of flow over the flies during a period of ten minutes by means of a siphon (*G*) or a waterpump (*H*). To facilitate an even distribution of the gas over the flies, the latter were kept in a tube (*D*) of 2.5×12 cm placed in horizontal position . Before the gas reached the flies it was passed through a glas spiral (*C*), immersed in a waterbath at 20° C. The temperature of the fume cupboard in which the exposures were done was also held close to 20° C. After the gas had passed over the flies it was led through a flask with potassium hydroxide (*F*) serving to bind the free cyanide gas. An empty flask (*E*) was interposed between the container (*D*) and the flask containing KOH (*F*), so as to prevent back flow from the latter. After the exposure was over the flies were decontaminated by closing tap 2 and opening tap 3.

The formaldehyde used was a 36% B. D. H. commercial preparation. All solutions were made with a 0.7% solution of sodium chloride in distilled water. Two-to-three day old Oregon-K males were injected intra-abdominally with 0.28 mm^3 of such solutions and were afterwards tested for the incidence of sex-linked lethals by means of the Basc (Muller-5) method; the first matings being started one day after treatment. To reduce the time interval between cyanide pretreatment and injection with formaldehyde, the flies were pretreated in separate batches of about 30 individuals which were then injected immediately afterwards; the time interval between pretreatment and injection is indicated separately for the different experiments.

In some of the experiments the sensitivity pattern in the testes was studied by re-mating the treated males to three fresh virgin Basc females at specific time

intervals. The successive broods arising in this way then represent successively younger stages of spermatogenesis at the time of treatment. No controls were used, because the spontaneous rate of sex-linked lethals in the Oregon-K stock rarely exceeds 0.2—0.3%.

Results

1. The effect of cyanide on the mutagenic action of formaldehyde

The results of experiments with three different concentrations of formaldehyde are set out in Table 1 and Fig. 2. It is seen that in the first broods pretreatment with cyanide gas significantly increased the mutagenic effectiveness of the two lower formaldehyde concentrations (Expts 1 and 2). Since exposure to cyanide gas alone does not raise the spontaneous mutation rate (see Table 2), the observed enhancement can therefore be considered as a proper potentiating effect of cyanide on the mutagenic action of formaldehyde.

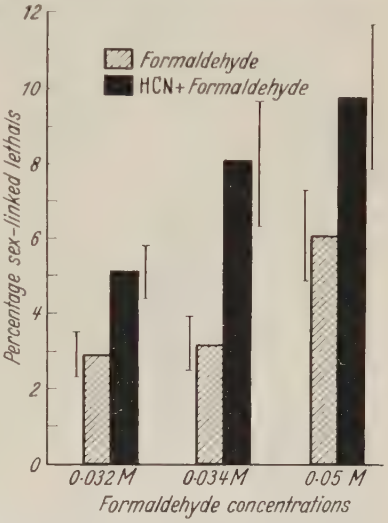


Fig. 2. The frequency of sex-linked lethals during the first three days after treatment from males which had been exposed to cyanide gas prior to injections with different concentrations of formaldehyde, as compared with that from males which received formaldehyde only

In the second broods of these experiments the results are less clear. In Expt. 2 pretreatment caused a significant increase of the mutation rate induced by formaldehyde; in Expt. 1 mutation rates in the pretreated- and formaldehydecontrol groups were about equal. In Expt. 2 a third brood from 7—10 days after treatment still showed the enhancing effect: in group F_2 1 lethal occurred in 327 chromosomes and in CN—F_2 3 lethals in 160 chromosomes.

The potentiating effect of cyanide was also observed when, as in Expt. 3, cyanide treatment preceded the injection of a stronger, highly mutagenic concentration of formaldehyde. Great sterility, probably due to the potent mutagenic combination did not permit the testing of more germ cells

Table 1. *The frequency of sex-linked lethals in two successive broods from males which had been subjected to treatment with cyanide gas prior to injections with formaldehyde, as compared with that from males which were injected with formaldehyde only*

Experiment	Formaldehyde concentration	Interval between pretreatment and formaldehyde injection	Sex-linked lethals — Days after treatment									
			1—4					4—7				
	Mols/l	min	n	nl	% l	χ^2	P	n	nl	% l	χ^2	P
F_1	0.032		923	27	2.9			519	6	1.2		
CN—F_1	0.032	22±19	916	47	5.1	10.06	<0.01	738	14	1.9		
F_2	0.034		625	21	3.2			438	8	1.8		
CN—F_2	0.034	15±13	270	21	8.1	11.06	<0.001	173	12	6.9	9.09	<0.01
F_3	0.050		418	25	6.1			330	16	4.9		
CN—F_3	0.050	15±12	242	23	9.8	2.56	<0.2	190	6	3.0		

Table 2. *The effect of cyanide pretreatment on the frequency of sex-linked lethals (1—4 days after treatment) from males which had been injected with mixtures of formaldehyde and hydrogen peroxide and formaldehyde only*

Experiments		1. Formaldehyde (0.028 M) with or without H_2O_2 (0.022 M)			2. Formaldehyde, (0.030 M) with or without H_2O_2 (0.023 M)			3. Formaldehyde, (0.033 M) with or without H_2O_2 (0.026 M)			Σ 1—3		
		n	*nl*	%*l*	*n*	*nl*	%*l*	*n*	*nl*	%*l*	*n*	*nl*	%*l*
A	CH_2O	569	14	2.5	329	5	1.5	401	11	2.4	1359	30	2.2
B	$HCN+CH_2O$	519	20	3.9	361	17	4.7	234	18	7.7	1114	55	4.9
C	$CH_2O+H_2O_2$	502	13	2.6	339	3	0.9	132	—	—	973	16	1.6
D	$HCN+(CH_2O+H_2O_2)$...	595	20	3.4	452	9	2.0	125	4	3.2	1172	33	2.8
		HCN + NaCl (0.7%)			H_2O_2 (0.023 M)			HCN + H_2O_2 (0.023 M)			χ^2 A– B = 11.29; $P < 0.001$		
	Controls										χ^2 C– D = 3.27; $P < 0.1$		
		506	1	0.2	578	1	0.2	668	2	0.3	χ^2 B–D = 6.94; $P < 0.01$		

in the pretreated group. In the second brood of series CN-F_3 a slight reduction is observed, as compared to that of F_3. It is possible that in this stage of spermatogenesis, germ cells which otherwise would have shown mutations, were selectively affected by the combined treatment.

2. The effect of cyanide on the mutagenic effectiveness of mixtures of formaldehyde and hydrogen peroxide

It has been mentioned before that, contrary to observations made on *Neurospora*, mixtures of formaldehyde and hydrogen peroxide did not produce more mutations in *Drosophila* than corresponding concentrations of formaldehyde alone (Sobels, l. c.). This result was ascribed to a high catalase activity, responsible for a rapid breakdown of the hydrogen peroxide in the fly.

Once it had been established that catalase inhibition raised the mutagenic efficacy of formaldehyde, it was thought of interest to study the effect of cyanide pretreatment on the mutagenicity of the formaldehyde-hydrogen peroxide mixtures. The proportions of formaldehyde and hydrogen peroxide in the mixtures was the same as the one applied successfully to *Neurospora* spores by Jensen *et al.* (l. c.). To reduce possible chemical alterations in the mixture it was freshly prepared before each injection series and used shortly after its preparation. The results of three experiments with different concentrations are shown in Table 2; the combined data are set out in Fig. 3.

First of all, it is seen that in the controls (bottom line), treatment with cyanide gas did not raise the spontaneous mutation rate. This result confirms the earlier finding that injection of a sublethal concentration of potassium cyanide does not produce mutagenic effects in *Drosophila* (Sobels 1955). Injection of hydrogen peroxide and also of hydrogen peroxide preceded by an exposure to cyanide gas did not increase the spontaneous mutation rate.

These findings are in sharp contrast to results obtained on microorganisms by WYSS *et al.* (1948) and WAGNER *et al.* (1950), where both cyanide and hydrogen peroxide produce mutations. According to WYSS *et al.* (l. c.) hydrogen peroxide is probably not the direct mutagenic agent, but rather serves as the initial step in the production of organic peroxides. It is not possible to decide whether in our experiments too low a concentration of hydrogen peroxide caused the negative results, or whether other biochemical pathways are required for the production of mutations. In this connection it is of interest to mention KIMBALL's (1955) recent results with *Paramecium*, where even strong concentrations of hydrogen peroxide, combined with potassium cyanide, did not produce mutations.

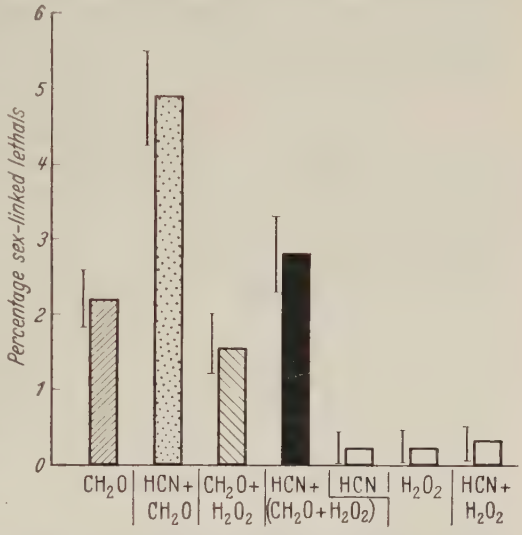


Fig. 3. The effect of cyanide pretreatment on the frequency of sex-linked lethals from males which had been injected with formaldehyde-hydrogen peroxide mixtures and formaldehyde alone

A comparison of the mutation rates in groups A and B shows that also in these experiments cyanide exerted a potentiating effect on the mutagenicity of formaldehyde. These results are in good agreement with those presented in Table 1. The mutagenic efficacy of the formaldehyde-hydrogen peroxide mixture (C) was about equal or slightly less than that of formaldehyde alone (A). This result agrees with the earlier data of SOBELS (1954). A comparison of groups C and D shows that cyanide enhanced the mutagenic effectiveness of the formaldehyde-hydrogen peroxide mixture, but not to the same level as that attained after cyanide-formaldehyde treatment. After pretreatment with cyanide the mutagenic effectiveness of the mixture of formaldehyde with hydrogen peroxide (D) was significantly lower than that of formaldehyde alone (B).

A similar observation has been made by AUERBACH (in the press), who found that feeding a mixture of formaldehyde and hydrogen peroxide to larvae produced fewer mutations than formaldehyde food alone. Altogether it is clear that even after catalase inhibition the mixture is not more mutagenic in *Drosophila* than formaldehyde alone.

Discussion

Cyanide pretreatment increased the mutagenic effectiveness of injected formaldehyde in altogether six independent experiments. These results support the hypothesis that formaldehyde exerts at least part of its mutagenic effects *via* the formation of peroxides.

In trying to picture the possible chemical steps involved in the mutagenic action of formaldehyde, the following considerations should be made. First of all, it is known that formaldehyde can react with hydrogen peroxide, so as to

form the dihydroxydimethyl peroxide ($HO—CH_2—O—O—CH_2—OH$), a substance which conveniently could be described as formaldehyde peroxide. This compound acts as a mutagen in *Drosophila*. Moreover, there is a marked similarity between the patterns of sensitivity to the mutagenic effects of formaldehyde and of dihydroxydimethyl peroxide; both substances produce mutations in mature sperm and in an earlier stage of spermatogenesis (Sobels 1956, and unpublished data).

The enhancement of formaldehyde-induced mutation rates, as observed after cyanide pretreatment would suggest that an increased content of hydrogen peroxide is primarily responsible for this effect. Cyanide inhibits both the cytochrome and the catalase enzyme systems. When the cytochromes are inhibited, the flavoproteins are supposed to act in greater measure than usual as terminal oxidases, thereby producing large amounts of hydrogen peroxide. The simultaneous inactivation of catalase will further facilitate the accumulation of the hydrogen peroxide. It would seem then that the presence of more hydrogen peroxide is an important prerequisite for the production of mutations by formaldehyde, presumably so, because it favours the formation of the mutagenic substance dihydroxydimethyl peroxide.

Earlier experiments showed, however, that hydrogen peroxide, if brought into the fly, is decomposed immediately. This raises the question how formaldehyde manages to produce mutations without cyanide pretreatment. A possible answer to this question is the fact that, according to the observations of K.G. Stern (1932), formaldehyde in its own right exerts an inhibiting effect on catalase activity.

It will be recalled that, after pretreatment with cyanide, a mixture of hydrogen peroxide with formaldehyde produced fewer mutations than formaldehyde alone. An interpretation of this effect must remain speculative. According to chemical observations of Wieland and Wingler (1923), it is probable that dihydroxydimethyl peroxide is formed in the formaldehyde-hydrogen peroxide mixtures. This substance, however, is more toxic for the flies than formaldehyde. It has been observed that certain concentrations of dihydroxydimethyl peroxide give optimal mutagenic effects. Treatment with still higher concentrations resulted in great sterility, and the sperm cells available for testing showed a relative reduction of the mutation rate. Similarly it was found that pretreatment with cyanide only increases the mutagenic effects of low doses of dihydroxydimethyl peroxide, but not of strong doses (Sobels, unpublished). These findings can be interpreted by assuming, that high concentrations of dihydroxydimethyl peroxide, or of the combination of cyanide and this peroxide, selectively eliminated germ cells with induced mutations. It is possible that a similar explanation may apply to the fact that the addition of hydrogen peroxide to formaldehyde reduced the mutagenic effect on flies which had been pretreated with cyanide. The results presented in Table 2 with different concentrations of the mixture do not contradict such an interpretation. At the highest concentration (Expt. 3) the sterility in group D was much greater than at the lowest concentration (Expt. 1). Moreover, the mutation rate in group D, as compared to group B, was reduced to a greater extent at the higher concentration (Expt. 3) than at the lower concentration

(Expt. 1). One might expect that, after cyanide pretreatment, still lower concentrations of the mixture are more mutagenically effective than corresponding concentrations of formaldehyde alone. This question is under further investigation.

We do not yet have a satisfactory explanation for the finding that in mature spermatozoa injected formaldehyde has a greater mutagenic effectiveness than dihydroxydimethyl peroxide. The assumption that the formation of dihydroxydimethyl peroxide accounts entirely for the mutagenic action of formaldehyde might therefore be an over-simplification.

The authors want to thank Dr. CHARLOTTE AUERBACH and Mr. M. J. D. VAN DAM for reading the manuscript and helpful comments.

Summary

Drosophila males were exposed to a sublethal concentration of cyanide gas prior to the injection of formaldehyde solutions. Compared to the controls which only received formaldehyde the frequency of sex-linked lethals was increased after the cyanide pretreatment in altogether six independent experiments. These results are taken as further proof that formaldehyde exerts at least part of its mutagenic effects via the formation of peroxides. It is suggested that an excessive amount of hydrogen peroxide, due to inhibition of the cytochrome and catalase enzyme systems, favours the formation of a mutagenic, organic peroxide, presumably dihydroxydimethyl peroxide. The fact that formaldehyde exerts an inhibiting effect on catalase in its own right might be of importance for the interpretation of its mutagenic action.

It was also observed that after cyanide pretreatment, the mutagenic effectiveness of a mixture of formaldehyde and hydrogen peroxide was lower than that of formaldehyde alone. These findings can be interpreted by assuming that high concentrations of dihydroxydimethyl peroxide or of a combination of cyanide and this peroxide, eliminate selectively germ cells with induced mutations. It is possible that the same explanation applies to the low mutagenic effectiveness of a mixture of formaldehyde and hydrogen peroxide compared with that of formaldehyde alone when both are preceded by cyanide.

Literature cited

AUERBACH, C.: Mutation tests on *Drosophila melanogaster* with aqueous solutions of formaldehyde. Amer. Naturalist **86**, 330 (1952). — Sensitivity of *Drosophila* germ cells to mutagens. Heredity (Lond.) **6**, Suppl. 247 (1953). — An analysis of the mutagenic action of formaldehyde food. III. Conditions influencing the effectiveness of the treatment. Z. Vererbungslehre (in the press). — AUERBACH, C., and H. MOSER: An analysis of the mutagenic action of formaldehyde food. I. Sensitivity of *Drosophila* germ cells. Z. Vererbungslehre **85**, 479 (1953). — DICKEY, F. H., G. H. CLELAND and C. LOTZ: The rôle of organic peroxides in the induction of mutations. Proc. Nat. Acad. Sci. *U.S.A.* **35**, 581 (1949). — HERSKOWITZ, I. H.: Formaldehyde-induced mutation in mature spermatozoa and early developmental stages of *Drosophila melanogaster*. Genetics **38**, 668 (1953). — The production of mutations in *Drosophila melanogaster* with chemical substances administered in sperm baths and vaginal douches. Genetics **40**, 76 (1955). — JENSEN, K. A., I. KIRK, G. KØLMARK and M. WESTERGAARD: Chemically induced mutations in *Neurospora*. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. **16**, 245 (1951). — KIMBALL, R. F.: The rôle of oxygen and peroxide in the production of radiation damage in *Paramecium*. Ann. New York Acad. Sci. **59**, 638 (1955). — SOBELS, F. H.: Mutation tests with a formaldehyde-hydrogen peroxide mixture in *Drosophila*. Amer. Naturalist 88, 109

(1954a). - Mutagenicity of dihydroxydimethyl peroxide. Drosophila Informat. Serv. **28**, 156 (1954b). — The effect of pretreatment with cyanide and azide on the rate of X-ray induced mutations in *Drosophila*. Z. Vererbungslehre **86**, 399 (1955). — Organic peroxides and mutagenic effects in *Drosophila*. Mutagenicity of dihydroxydimethyl peroxide and the mutagenic effects of formaldehyde. Nature (Lond.) **177**, 979 (1956). — Stern, K. G.: Über die Hemmungstypen und den Mechanismus der katalystischen Reaktion. 3. Mitt. über Katalase. Hoppe-Seylers Z. **209**, 176 (1932). - Wagner, R. P., C. H. Haddox, R. Fuerst and W. S. Stone: The effect of irradiated medium, cyanide and peroxide on the mutation rate of *Neurospora*. Genetics **35**, 237 (1950). — Wieland, H., and A. Wingler: Über den Mechanismus der Oxydations-Vorgänge. V. Zur Oxydation der Aldehyde. Liebigs Ann. **431**, 301 (1923). — Wyss, O., J. Bennet-Clark, F. Haas and W. S. Stone: The rôle of peroxide in the biological effects of irradiated broth. J. Bacter. **56**, 51 (1948).

Dr. F. H. Sobels, Genetisch Instituut der Rijksuniversiteit,
Stationsstraat 9, Utrecht (Holland)

Zeitschrift für indukt. Abstammungs- und Vererbungslehre, Bd. 87, S. 743–752 (1956)

Institute of Genetics of the State University Utrecht, Netherlands

STUDIES ON THE MUTAGENIC ACTION OF FORMALDEHYDE IN *DROSOPHILA*

II. THE PRODUCTION OF MUTATIONS IN FEMALES AND THE INDUCTION OF CROSSING-OVER

By

F. H. Sobels

With 1 figure in the text

(Eingegangen am 2. Juli 1956)

Formaldehyde has been applied to *Drosophila* females in various ways, but the results of these experiments consistently showed that the ovary is refractory to the mutagenic action of formaldehyde.

Independent work of Herskowitz (1950) and of Auerbach (1951) indicated that female *Drosophila* larvae grown on formaldehyde food throughout larval life do not possess a higher mutation rate than the controls. Auerbach and Moser (1953a) considered the possibilities that the ovary might respond only during a limited period of larval life or that only a restricted zone in the earlier stages of oogenesis would be sensitive to the mutagenic action of formaldehyde food. Extensive experiments in which larvae were treated at different stages of development, followed by mutation tests in four subsequent broods all rendered, however, exclusively negative results, the overall mutation rate being 0.2% out of a total of 8418 tested female X-chromosomes. Feeding formaldehyde to adults likewise did not produce mutations. Injection of a 0.3% formaldehyde solution into adult females gave a similar result: only 1 sex-linked lethal was found in 796 chromosomes (Auerbach 1952).

Herskowitz (1955) tested for mutations in females after application of vaginal douches and sperm baths. Postcopulatory vaginal douches were slightly more effective (0.33% lethals in 4796 tested X-chromosomes) than sperm baths (0.16% lethals in 3806 tested chromosomes). But it is evident that also here formaldehyde did not appreciably raise the spontaneous mutation rate in egg X-chromosomes.

The observations of Sobels and Simons (1956) that cyanide exerts a potentiating effect on formaldehyde mutagenesis supports the hypothesis that the formation of hydrogen peroxide and of an organic peroxide is involved in the production of mutations by injected formaldehyde in *Drosophila*. It was therefore thought that the lack of mutagenic effects of formaldehyde in females might possibly be explained by a greater activity of enzymes responsible for the breakdown of the active peroxides in females. This assumption has been tested by exposing females to cyanide gas prior to injection with different concentrations of formaldehyde.

In the course of this investigation observations were made, suggesting that formaldehyde is capable of inducing crossing-over in a genetical situation where

crossing-over is normally inhibited by inversions. This idea has been put to further test by experiments on the induction of crossing-over in males, the results of which will be reported in the last part of this paper.

Material and methods

The methods employed for pretreatment with cyanide gas and for injection with formaldehyde solutions were essentially the same as those described before for males (Sobels and Simons, 1956). The concentrations of the formaldehyde solutions for females were higher than those for males; they ranged from 0.087 to 0.103 Mols formaldehyde per litre.

For the detection of sex-linked lethals in females a mating scheme, combining the advantage of a simple check for the presence of pre-existing lethals with the possibility of collecting F_1 females which are automatic virgins, was kindly suggested to me by Dr. I. I. Oster from Indiana University (Bloomington, Ind.). Three to five day-old females, heterozygous for different markers and effective crossing-over suppressors, of the constitution y w In 49 f/y sc ^{S1} B In S were used for treatment. They were mated to X. Y In E N v ptg oc sn^5 males. This stock contains the X-chromosome-having Y^S at its left end and Y^L at its right end, with inversion of the whole euchromatic region with respect to the centromere, constructed by Lindsley and Novitski (1950). The flies show the visible markers vermilion, pentagon, ocelliless and singed 5. Since no free Y is present, all F_1 males are sterile and the F_1 females are automatic virgins. Pre-existing lethals are detected by the absence in F_1 of males which are y w f or y B. The sequence of matings is presented below:

Treatment

P_0 y w In 49 f ♀ × y sc^{S1} B In S ♂

↘↘

P_1 y w In 49 f / y sc^{S1} B In S ♀ × X. Y In E N v ptg oc sn^5 ♂

F_1 y w In 49 f / X. Y In E N v ptg oc sn^5 ♀ — y sc^{S1} B In S / X. Y In E N v ptg oc sn^5 ♀

automatic virgins

y w In 49 f ♂ — y sc^{S1} B In S ♂

P_2 y w In 49 f / X. Y In E N v ptg oc sn^5 ♀ × X. Y In E N v ptg oc sn^5 ♂

F_2 y w In 49 f / X. Y In E N v ptg oc sn^5 ♀ — X. Y In E N v ptg oc sn^5 / X. Y In E N v ptg oc sn^5 ♀

y w In 49 f ♂ — X. Y In E N v ptg oc sn^5 ♂

Absence of the y w f ♂♂ in the F_2 indicates the presence of an induced lethal in one of the maternal X-chromosomes. Originally it was thought that both classes of F_1 females could be used for the mutation test. A pronounced reduction of viability in the y sc^{S1} B In S males, however, did not make y sc^{S1} B In S/X. Y In E N v ptg oc sn^5 females suitable for testing. To ensure maximum number of F_1 females for the mutation tests, Dr. Oster's original scheme was therefore slightly modified in that for the later experiments females heterozygous

for y w In 49 f and sc^{8^1} B In S w^a sc^8 (Basc) chromosomes were treated. This made possible the use of both y w In 49 f/X. Y In E N v ptg oc sn^5 and sc^{8^1} B In S w^a sc^8/X. Y In E N v ptg oc sn^5 females for the test. In the F_2 of the latter the absence of w^a B males served to indicate the presence of an induced lethal. Only later it was realized that crossing-over can occur between inversion E N and the scute inversions of the Basc chromosome, so as to result in the possible loss of induced lethals. From then onwards only F_1 females heterozygous for y w In 49 f were used for the mutation tests.

The treated females were mated one day after treatment. To study the sensitivity pattern in the ovary two broods were made; brood *a* from one to three, and brood *b* from four to six days after the first mating.

Results

1. The mutagenic effect of formaldehyde in females

In a pilot experiment, carried out in collaboration with Mr. SIMONS, wild type Oregon-K females received 0.39 mm^3 of a 0.067 M formaldehyde solution after an exposure to cyanide gas. A test for sex-linked lethals revealed 3 lethals in 29 tested chromosomes. Although no precaution was taken to guard against the presence of pre-existing lethals, and the number of tested chromosomes was too small for any definite conclusion, this result made it probable that formaldehyde possesses mutagenic activity for females if it is preceded by cyanide treatment.

The results of further experiments with three different concentrations of formaldehyde are set out in Table 1 and Fig. 1.

Table 1. *The frequency of sex-linked lethals in two successive three-day broods from females which had been exposed to cyanide gas prior to injections with formaldehyde, as compared with that from females which were injected with formaldehyde only*

Experiment	Concentration Formaldehyde	n ♀ ♀ injected	% mortal. and sterility	n ♀ ♀ with progeny	Brood *a*			Brood *b*			Total *a* + *b*		
					n chrom.	n leth.	% leth	n chrom.	n leth.	% leth.	n chrom.	n leth.	% leth.
FF_1	0.087 M	34	5.9	32	510	1	0.20	509	1	0.20	1019	2	0.20
$CN-FF_1$	0.087 M	96	26.0	71	370	3	0.81	626	2	0.32	996	5	0.50
FF_2	0.095 M	52	48.1	27	214	1	0.47	305	2	0.66	519	3	0.57
$CN-FF_4$	0.095 M	54	85.2	8	52	—	—	101	3	2.98	153	3	1.96
$CN-FF_5$ . .	0.095 M	25	48.0	13	94	1	1.06	157	—	—	251	1	0.40
$CN-FF_7$ . .	0.095 M	43	83.7	7	48	1	2.08	93	2	2.15	141	3	2.12
$CN-FF_9$ . .	0.095 M	49	63.2	18	100	1	1.00	304	1	0.33	404	2	0.50
$\sum CN-FF_{4-9}$.	0.095 M	171	73.0	46	294	3	1.02	655	6	0.92	949	9	0.95
FF_3	0.103 M	21	4.8	20	203	4	1.97	452	—	—	655	4	0.61
$CNFF_2$ . . .	0.103 M	37	83.8	6	17	—	—	126	1	0.79	143	1	0.70
$CNFF_3$ . . .	0.103 M	35	68.6	11	40	3	7.50	190	1*	0.53	230	4	1.74
$\sum CNFF_{2-3}$. .	0.103 M	72	76.5	17	57	3	5.26	316	2	0.63	373	5	1.34
Total Formaldehyde . .		107	26.2	79	927	6	0.65	1266	3	0.24	2193	9	0.41
Total Cyanide + Formaldehyde		339	60.5	134	721	9	1.25	1597	10	0.63	2318	19	0.81

* This lethal occurred in a female which also had a lethal in brood *a*.

In Expt. FF_1 0.2% sex-linked lethals were observed after the injection of a 0.087 M formaldehyde solution. This figure can presumably be used as an approximation of the spontaneuos mutation rate in the y w In 49 f chromosome. However in brood *a* of Expt. FF_3 a stronger formaldehyde concentration (0.103 M) had a definite mutagenic effect by itself.

With all three concentrations used, cyanide exerted a potentiating effect on the mutagenicity of formaldehyde. This effect is particularly clear in Expt. $CNFF_3$ in which 3 lethals occurred in 40 chromosomes. The figures on mortality and sterility show, however, that in order to obtain such a clear-cut mutagenic effect of formaldehyde in females, one has to work with highly toxic concentrations. Apart from killing the majority of the injected flies such concentrations cause a drastic reduction of fertility, so that only a few chromosomes remain available for the mutation test. A comparison of the mutation rates observed in broods *a* and *b* suggests that on the whole the more mature stages, as sampled in brood *a*, possess greater sensitivity to the mutagenic action of formaldehyde.

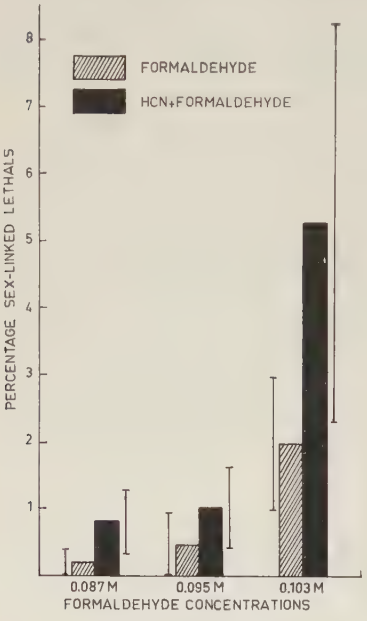


Fig. 1. The frequency of sex-linked lethals during the first three days after treatment from y w In 49 f/sc^{s1} B In S females which had been exposed to cyanide gas prior to injection with different concentrations of formaldehyde, as compared with that from females which received formaldehyde only

The low number of tested chromosomes and the small absolute frequencies of mutations are the cause that the difference found between the mutation rates from flies which were pretreated with cyanide and those that received formaldehyde alone, is not significant. The presented results should therefore be considered more as a qualitative proof that *Drosophila* females are sensitive to the mutagenic action of injected formaldehyde and that pretreatment with cyanide helps to bring this effect into the open.

2. The effect of formaldehyde on sperm stored in the females

Auerbach (1952) reported that no mutations were found in spermatozoa which had been treated by injection of 0.3% formaldehyde in inseminated females. After application of formaldehyde in sperm baths, Herskowitz (1955) observed only a slight mutagenic effect: 0.72% lethals were induced in 4284 X-chromosomes. The application of formaldehyde by means of sperm baths is not quite comparable to injection into inseminated females. With the latter method, formaldehyde has to pass through the female body fluids before it reaches sperm stored in the receptacle and spermathecae, whereas in sperm baths the chemical is applied directly to the sperm.

It is possible that these negative results, especially those of Auerbach, are due to the same cause which is responsible for the apparent lack of mutagenic effects of formaldehyde on female germ cells. On this assumption it is also con-

ceivable that more mutagenic effects might be expected with the sperm bath method.

To test this idea Basc (Muller-5) females, inseminated by wild type males of the Oregon-K strain were treated with cyanide prior to an injection with formaldehyde. Tests for the incidence of sex-linked lethals in the paternal X-chromosomes were then carried out by means of the usual Basc technique. In all experiments one-day old Oregon-K males were allowed to mate with 3—5 day-old Basc females for a period of two days.

In the first experiment of this kind it was observed that inseminated females have a much greater sensitivity than virgin females to the toxic effects of the combined cyanide-formaldehyde treatment. Lower concentrations of formaldehyde and of potassium cyanide in the gas-apparatus were therefore used for treating the inseminated females. But even then a considerable proportion of the flies were either killed or sterilized by the combined treatment. These findings suggest that after insemination physiological changes occur in the female organism which result in an increased susceptibility to the toxic effect of the above chemicals. It is not possible to say whether there is any correlation between this effect and the insemination reaction, as observed after copulation by Patterson and Stone (1952).

Table 2. *The frequency of sex-linked lethals in sperm stored in females which had been treated with cyanide gas prior to an injection with formaldehyde and in inseminated females which received only formaldehyde*

Experiment	Concentr. formaldehyde	n. chrom.	n. leth.	% leth.
FS_1. . .	0.063 M	332	—	—
$CN—FS_1$	0.063 M	487	6	1.2
FS_2 . .	0.073 M	492	8	1.6
$CNFS_3$.	0.073 M	136	1	0.7
$CNFS_4$.	0.068 M	497	7	1.4

The results of experiments with three different concentrations are presented in Table 2.

The data of Expts. $CN—FS_1$ and $CN—FS_4$ clearly show that formaldehyde, if preceded by cyanide, has mutagenic effects on sperm stored in females. It is also seen that without cyanide pretreatment the lowest formaldehyde concentration of 0.063 M in Expt. FS_1 did not produce mutations in stored sperm. The data of Expt. FS_2 show, on the other hand, that a higher concentration of 0.073 M formaldehyde is mutagenically effective. However, this concentration preceded by an exposure to cyanide gas proved so toxic to the flies that the low mutation rate in Expt. $CN—FS_3$ can conceivably be explained by assuming that spermatozoa with induced mutations were selectively eliminated.

3. The induction of crossing-over by formaldehyde

As has been mentioned before, part of the investigation on the mutagenic effectiveness of formaldehyde in females has been carried out by treating females of the genetic constitution y w In 49 f/sc^{S1} B In S w^a sc^8, which were then crossed to X. Y In E N v ptg oc sn^5 males. For the detection of lethals in the y w In 49 f chromosome, y w In 49 f/X. Y In E N v ptg oc sn^5 individuals from the F_1 progeny were mated individually to X. Y In E N v ptg oc sn^5 males.

In two such experiments (FF_2, using 0.095 M formaldehyde, and $CN—FF_8$, using 0.095 M formaldehyde preceded by cyanide) some of the F_2 cultures contained, apart from y w f flies, w f and w^a f individuals. From the data set out

in Table 3 it is seen that out of a total of 1152 progeny ten cultures with white forked, and two cultures with apricot forked flies were observed.

These exceptional genotypes can be explained by assuming recombination between the y w In 49 f and the sc^{S1} B In S w^a sc^8 chromosomes, crossing-over between yellow and white giving rise to the w f individuals and between white and forked resulting in the w^a f class of flies. The complementary classes of, respectively, y w^a B and y w B individuals have not been observed, because in these experiments F_1 females carrying the Basc chromosome were not used for the mutation tests, and unfortunately possible crossovers were overlooked in the F_1 progeny.

Table 3. *The frequency of recombination between y, w and f, derived from y w In 49 f/sc^{s1} B In S w^a sc^8 females, in successive broods of the F_2 of Experiments FF_2 and $CNFF_8$*

Experiment	Brood	Number of F_2 cultures: y w f	w f	w^a f
FF_2	*a*	214	{3 1	—
	b	305	—	—
	c	302	{3 1	—
$CN—FF_8$	*a*	85	—	—
	b	246	2	2
Σ		1152	10	2

Recombinants in the progeny of the same female are bracketed together.

The occurrence of crossing-over between yellow (0.0) and white (1.5) in a y w In 49 f/sc^{S1} B In S w^a sc^8 heterozygote is, however, normally not to be expected. The combined scute inversions of the Basc chromosome are supposed to suppress crossing-over to a great extent throughout almost the entire X-chromosome, and the inversion delta 49 covers that part of the X-chromosome, delimitated by the loci of rb (7.5) and g (44.4) (Bridges and Brehme 1944). The recombinants observed in the above experiments would therefore suggest that injection with formaldehyde resulted in the induction of crossing-over in the structural heterozygote. This phenomenon might be comparable to the induction of crossing-over in oogonial stages by X-irradiation in Curly inversion heterozygotes, as observed by Hinton and Whittinghill (1950) and Whittinghill (1955). The recombinants found in broods b and c of respectively Expts. CN—F_8 and FF_2 might indicate that after formaldehyde treatment crossing-over also occurred in gonial stages. The data are too small, however, for any definite conclusion.

For a further test of the assumption that formaldehyde treatment may induce crossing-over in specimens where spontaneous crossing-over is naturally rare, experiments with males were carried out. One-day old males from a cross of Oregon-K and black purple vestigal were injected with formaldehyde. To obtain an estimate of the mutagenic effectiveness of the formaldehyde concentrations used, these males were mated individually to three Base females during the first three days after treatment. Hereafter they were backcrossed to three b pr vg females at three-day intervals.

To facilitate a comparison with Auerbach's (1954) data on X-ray induced crossing-over, the results set out in Table 4, are tabulated in the same way.

Individuals showing one or two of the marker genes were observed in every brood. They were all scored as recombinants (r). This seems the correct interpretation for most of the individuals exhibiting two neighbouring marker genes (r_2), whereas those with only one marker gene (r_1) could also be due to either mutation or deficiency.

Table 4. *The frequency of recombinants in successive broods from males heterozygous for b pr vg which had been injected with formaldehyde, and b pr vg females. For brood a the frequency of sex-linked lethals is indicated*

Experiment. Concentration Formaldehyde	Sex-linked lethals		Total offspring (n) and recombinants (r) showing one (r_1) or two (r_2) of the recessive markers											
	brood *a* (1—4)		brood *b* (4—7)				brood *c* (7—10)				brood *d* (10—13)			
	n chrom.	% leth.	n	r	r_1	r_2	n	r	r_1	r_2	n	r	r_1	r_2
F—C_1 0.047 M	476	5.0	3078	1 b 1 pr {3 vg *	5	–	1011	1 pr vg {3 vg *	3	1	2229	{6 b pr {2 vg {1 b pr {2 vg	4	7
F—C_2 0.037 M	544	2.9	5391	1 b 1 vg {1 b pr {1 vg	3	1	2902	–	–	–	6366	{4 b pr {3 b pr {1 b pr {1 vg 1 bpr 1 bpr 1 bpr 1 bpr 1 vg 1 vg	3	12
Σ	1020	3.8	8469	9	8	1	3913	4	3	1	8595	26	7	19

Recombinants in the progeny of the same male are bracketed together.

* The clusters of vg flies in broods *b* and *c* of Expt. FC_1 were all derived from the same male.

Altogether only one true crossover occurred in brood *b* and one in brood *c*. The bundles of vg flies from the same male in broods *b* and *c* of Expt. F—C_1 could possibly be explained by assuming a spontaneous mutation (or deficiency) at the vg locus in an earlier stage of development.

It is seen that in brood *d* genuine crossovers were much more frequent than in broods *b* and *c*. Clusters of recombinants derived from the same male are clear evidence that this brood was sampled from treated spermatogonia. Even the r_1 specimens in this brood are presumably due to crossing-over, especially when they appear together with the complementary r_2 class. Moreover, the mutation rate induced by formaldehyde in this brood, though not negligible, is usually low (Sobels 1954 and unpublished work). Because of the low absolute frequency of crossing-over and the clustering of identical crossovers, a proper comparison between the mutagenic effectiveness of the two different formaldehyde concentrations in brood *a* and their efficacy in inducing crossing-over in brood *d* is not possible. In brood *d* the frequency of all recombinants lumped together is 0.49% in Expt. F—C_1, and 0.24% in Expt. F—C_2. For Auerbach's data on X-ray induced crossing-over these figures are 0.40% (n progeny = 3292), and 0.79% (n progeny = 2035) for dosages of 2000 r and 1800 r, respectively. The mutation rates induced at the stage of peak sensitivity in these two irradiation experiments were respectively, 11.2% (n = 353), and 5.9% (n = 490). Considering the fact that formaldehyde injected into males usually produces highest mutation rates in the first brood, it would seem that formaldehyde is about equally and certainly not less effective in inducing crossing-over than X-irradiation.

Discussion

Previous results suggested that the formation of hydrogen peroxide and of an organic peroxide plays a part in the production of mutations by formaldehyde in *Drosophila* (Sobels 1956, Sobels and Simons). It was thought therefore that the lack of mutagenic effect of formaldehyde in females, as observed by Auerbach and Herskowitz, might possibly be explained by a greater activity of enzymes, responsible for the rapid breakdown of the active peroxide component. The results presented in this paper favour this assumption, for formaldehyde produced mutations in females which had been pretreated with sub-lethal doses of cyanide gas.

It has further been assumed that the same causes which are responsible for the low mutagenicity of formaldehyde in females might explain the lack of mutagenic effect of formaldehyde on sperm stored in inseminated females. The preceding data show that a weak, non-mutagenic concentration of formaldehyde, preceded by exposure to cyanide gas, significantly raised mutation rate.

On the other hand, it was also observed that stronger concentrations of formaldehyde, when acting by themselves, produce mutations in both the female germ cells and in sperm stored in females. Because of the highly toxic effects of such concentrations, proper mutation tests were hardly feasible. Even the highest possible concentrations of formaldehyde are, however, still decidedly less mutagenic for females than for injected males (cf. Sobels 1954 and Sobels and Simons).

These results suggest that in the female organism factors are operating which reduce the mutagenic effectiveness of formaldehyde. Because pretreatment with cyanide, causing inhibition of catalase and the cytochromes, has such pronounced enhancing effects, it is probable that, as in males, so in females the formation of peroxides is involved in the production of mutations by injected formaldehyde. At present we do not know whether the same is also true for the mutagenic effects of formaldehyde if fed to the larvae. Consequently it cannot yet be decided whether the lack of mutagenicity of formaldehyde food in female larvae has the same causes as the low effectiveness of formaldehyde injections into adult females.

The preliminary observation of unusal recombinants in female structural heterozygotes led us to assume that formaldehyde may induce crossing-over. The results obtained with males, where crossing-over is naturally rare or does not occur, favoured this assumption. The formation of clusters suggested that crossing-over induced by formaldehyde predominantly occurred in the spermatogonial stages.

It would seem that formaldehyde is the first chemical for which this capacity of inducing crossing-over in males has been observed. Whittinghill (1948) reported that nitrogen mustard increased crossing-over in females in the spindle-attachement region. Unfortunately no more detailed data of his observations are available. Experiments done in collaboration with Mr. H. van Steenis showed that a treatment with mustard gas which was highly effective in the induction of lethals, only produced few crossovers.

Levine (1955) made the interesting observation that a deficiency for calcium, produced by feeding ethylenediamine-tetraacetic acid, caused a significant increase of crossing-over in females. It is not possible to say whether our results are biochemically related to those of Levine. His data, however, seem to apply to ordinary, meiotic crossing-over, whereas gonial crossing-over, as observed after

formaldehyde treatment and irradiation, may require quite a different situation for its initiation.

As has been mentioned before, there is a remarkable similarity between the kind and frequency of crossing-over induced by formaldehyde and by X- and gamma irradiation (cf. WHITTINGHILL 1955). This correspondence is open to various speculations. Evidence has recently been presented that the formation of peroxides may be involved in the production of mutations by X-rays in *Drosophila* (SOBELS 1956, a and b). Peroxides apparently also play a rôle in formaldehyde mutagenesis. It might therefore be more than a mere coincidence that a weakly mutagenic concentration of dihydroxydimethyl peroxyde, i.e. the organic peroxide which presumably is of importance in the production of mutations by formaldehyde, induced not less than 0.35% crossing-over in 6936 progeny examined in the fourth brood. Further details of these experiments done in collaboration with Mr. H. VAN STEENIS will be published in another context.

A possible interpretation of X-ray induced gonial crossing-over has been based on the cytological observations of COOPER (1949). It assumed that chiasmata in the gonial cells may serve as competent targets for the effective ionisations. In analogy to this interpretation, our results after formaldehyde treatment suggest that the organic peroxide, or whatever chemical is involved in the direct genetic effects, produces chromosome breakage at preformed sites, such as the gonial chiasmata. Other interpretations assuming unequal crossing-over, or breakage-first followed by reciprocal exchange would involve two breaks. The question whether one or two breaks are actually involved in the initiation of chemically-induced crossing-over is under further investigation.

The results on induced crossing-over may also serve as a measure of chromosome breakage, brought about by the chemical treatment. Until now there is no information available on the ability of injected formaldehyde to induce gross rearrangements. After feeding formaldehyde to the larvae AUERBACH and MOSER (1953b) observed a much lower frequency of translocations than would have been induced by X-ray doses of comparable mutagenic effectiveness. In analogy to the results obtained with mustard gas (NASRAT, KAPLAN and AUERBACH 1955) it could be assumed that this result is due to the delayed effect, of formaldehyde causing a non-simultaneous opening of the breaks. In contrast to the low frequency of gross rearrangements, the induction of crossing-over, seems a more common event.

I am much indebted to Dr. I. I. OSTER for putting his ingeneous mating scheme and the stocks required for mutation tests in females at my disposition and to Dr. CHARLOTTE AUERBACH for reading the manuscript and correcting the English. The technical assistance received from Miss V. VAN DEN HUL is gratefully acknowledged. This work was supported in part by the Health Research Council T.N.O.

Summary

1. *Drosophila* females were exposed to cyanide gas prior to injection with different concentrations of formaldehyde. Compared to females which only received formaldehyde the frequency of sex-linked lethals was increased after the cyanide pretreatment.

2. Cyanide also enhances the mutagenic effects of formaldehyde on sperm stored in inseminated females.

Inseminated females have a much greater susceptibility to the toxic effects of the cyanide-formaldehyde combination than virgin females.

3. Even without cyanide-pretreatment, high concentrations of formaldehyde, causing a drastic reduction of fertility, produce mutations in female X-chromosomes and in sperm stored in females.

4. The results favour the assumption that peroxides are involved in the production of mutations by injected formaldehyde and that in females enzymes responsible for the breakdown of such peroxides have greater activity than in males.

5. The occurrence of unusual recombinants in the progeny of female structural heterozygotes suggested that formaldehyde possibly induces crossing-over.

6. This idea is supported by results obtained on males. After injection with mutagenic concentrations of formaldehyde, clusters of identical and complementary crossovers were observed in the fourth brood, i.e. in stages sampled 10—13 days after treatment. This suggested that crossing-over induced by formaldehyde mainly occurs in the spermatogonial stages.

7. A comparison with the frequency of crossing-over induced by X-irradiation shows that formaldehyde is about equally effective in inducing crossing-over as X-rays. In conclusion of the above results it would seem therefore that breakage of chromosomes by formaldehyde is not an altogether uncommon event.

Literature cited

Auerbach, C.: Some recent results with chemical mutagens. Hereditas (Lund) **37**, 1 (1951). — Mutation tests on *Drosophila melanogaster* with aquous solutions of formaldehyde. Amer. Naturalist **86**, 330 (1952). — Sensitivity of the *Drosophila* testis to the mutagenic action of X-rays. Z. Vererbungslehre **86**, 113 (1954). — Auerbach, C., and H. Moser: An analysis of the mutagenic action of formaldehyde food. I. Sensitivity of *Drosophila* germ cells. Z. Vererbungslehre **85**, 479 (1953). — II. The mutagenic potentialities of the treatment. Z. Vererbungslehre **85**, 547 (1953). — Bridges, C. B., and K. S. Brehme: The mutants of *Drosophila melanogaster*. Carnegie Inst. Publ. 552, 1944, 257. — Cooper, K. W.: The cytogenetics of meiosis in *Drosophila*. Mitotic and meiotic autosomal chiasmata without crossing-over in the male. J. of Morph. **84**, 81 (1949). — Herskowitz, I. H.: The differential induction of lethal mutations by formalin in the two sexes of *Drosophila*. Science (Lancaster, Pa.) **112**, 302 (1950). — The production of mutations in *Drosophilia melanogaster* with chemical substances administered in sperm baths and vaginal douches. Genetics **40**, 76 (1955). — Hinton, C. W., and M. Whittinghill: The distribution of X-ray induced crossovers from Curly inversion heterozygotes of *Drosophila melanogaster* females. Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. **36**, 552 (1950). — Levine, R. P.: Chromosome structure and the mechanism of crossing-over. Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. **41**, 727 (1955). — Lindsley, D. L., and E. Novitski: The synthesis of an attached XY chromosome. Drosophila Informat. Serv. **24**, 84 (1950). — Nasrat, G. E., W. D. Kaplan and C. Auerbach: A quantitative study of mustard-gas induced chromosome breaks and re-arrangements in *Drosophila melanogaster*. Z. Vererbungslehre **86**, 249 (1954). — Patterson, J. T., and W. S. Stone: The evolution in the genus *Drosophila*. New York: Macmillan & Co. 1952. 610 pp. — Sobels, F. H.: Mutation tests with a formaldehyde-hydrogen peroxide mixture in *Drosophila*. Amer. Naturalist **88**, 109 (1954). — Organic peroxides and mutagenic effects in *Drosophila*. Nature (Lond.) **177**, 979 (1956a). — The effect of formaldehyde on the mutagenic action of X-rays in *Drosophila*. Experienta (Basel) **12**, 318 (1956b). — Sobels, F. H., and J. W. I. M. Simons: Studies into the mutagenic action of formaldehyde in *Drosophila*. I. The effect of pretreatment with cyanide on the mutagenicity of formaldehyde and formaldehyde-hydrogen peroxide mixtures in males. Z. Vererbungslehre **87**, 735 (1956). — Whittinghill, M.: The effects of methyl - bis [beta-chloroethyl] amine upon recombination values in *Drosophila melanogaster*. Genetics **33**, 634 (1948). — Crossover variability and induced crossing over. J. Cellul. a. Comp. Physiol. **45**, Suppl. 2, 189 (1955).

Dr. F. H. Sobels, Genetisch Instituut der Rijksuniversiteit, Stationsstraat 9, Utrecht (Holland)

Zeitschrift für indukt. Abstammungs- und Vererbungslehre, Bd. 87, S. 753–768 (1956)

Aus dem Botanischen Institut der Universität Freiburg i. Br.

UNTERSUCHUNGEN ÜBER DIE GESCHLECHTSDIFFERENZIERUNG BEI HAPLOIDEN UND DIPLOIDEN GAMETOPHYTEN VON *BRYUM CAPILLARE* L.*

Von

Anita Hoffmann

Mit 17 Textabbildungen

(Eingegangen am 1. September 1956)

A. Einleitung

Die Verteilung der Geschlechter auf die Gametophyten der Laubmoose ist entweder eine getrenntgeschlechtige oder eine gemischtgeschlechtige. Im letzteren Fall können die beiden Sexualorgane sehr verschiedenartig auf die Stämmchen des aus einer Spore hervorgegangenen Rasens verteilt sein. Wir haben es also entweder mit einer haplogenotypischen oder mit einer haplophänotypischen Geschlechtsbestimmung zu tun. Nun sind die Laubmoose von jeher ein ausgezeichnetes Material, um damit zu experimentieren. Ihr antithetischer Generationswechsel läßt sich dadurch beliebig verändern, daß man Stücke eines diploiden Sporophyten zur Regeneration bringt. Diese Fragmente regenerieren nämlich nicht einen Sporophyten, sondern einen Gametophyten, und damit ist dann, ohne natürlich ihre Chromosomenzahl zu verändern, ein diploider Gametophyt gegeben. Haben wir es also mit einem Moos zu tun, das eine genotypische Geschlechtsbestimmung besitzt, also diözisch ist, dann muß in den neuen einheitlichen Gametophyten alles vereinigt sein, was sich auf die Geschlechtsbestimmung bezieht. Die grundlegenden Versuche auf diesem Gebiet machten bereits É. und Ém. Marchal (1907). Sie gingen von der naheliegenden Annahme aus, daß die bei haplodiözischen Moosen getrennten männlichen und weiblichen Anlagen sich beim Befruchtungsvorgang vereinen und die Zellen des Sporogons bisexuell sein müssen. An den durch Regeneration aus Sporogonen entstandenen bivalenten Rassen konnten sie dann tatsächlich die erwartete Zweigeschlechtigkeit nachweisen. Später wurden von v. Wettstein (1924) an *Bryum caespiticium* diese Versuche mit dem gleichen Ergebnis wiederholt. Auch von anderen diözischen Moosen, wie *Splachnum sphaericum* (Schweizer 1923, Bornhagen 1930), *Splachnum vasculosum* (Arens 1939) und *Eurhynchium Stokesii* (Moutschen 1954) wurden bivalente Rassen hergestellt. Bei diesen Moosen wurde die induzierte Zweigeschlechtigkeit höchst verschiedenartig ausgebildet. Darum erschien eine Ausdehnung auf andere haplodiözische Arten wünschenswert, um neue Aufschlüsse über die Wirkungsweise aller an der Geschlechtsbestimmung beteiligten Erbanlagen zu erhalten.

* Die vorliegende Arbeit ist die erste aus einer Reihe von genetischen Arbeiten an Moosen, die Professor Oehlkers im Rahmen des Schwerpunktes für Genetik im Botanischen Institut der Universität Freiburg i. Br. veranlaßt hat. Ich danke Herrn Professor Oehlkers für die Anregung sowie die Möglichkeit, mitarbeiten zu können, wozu die Forschungsgemeinschaft alle notwendigen Mittel zur Verfügung stellte. Auch dafür sei bestens gedankt.

B. Material und Methode

Die Ausgangsrasen unserer Kulturen von *Bryum capillare* L. stammen vom Lorettoberg bei Freiburg, wo sie im Februar 1954 am Waldrand gesammelt wurden. Die Pflanzen, deren junge Sporogone zu den Regenerationsversuchen verwendet wurden, wuchsen am gleichen Standort. Nach Angabe von LIMPRICHT (1885) und auch MÖNKEMEYER (1927) ist *Bryum capillare* eine stark polymorphe Art, bei der sich mehrere Formenkreise unterscheiden lassen. Das hier verwendete *Bryum capillare* entspricht nach der Diagnose von LIMPRICHT und MÖNKEMEYER der typischen Form.

Als Nährboden für die Einsporkulturen sowie für die zur Regeneration ausgelegten Sporogonstücke dienten 1,5%ige Agar-Agar-Nährplatten. Sie wurden mit der folgenden Nährlösung: Aqua dest. 1000 cm^3, NH_4NO_3 0,2 g, $CaCl_2$ 0,2 g, KH_2PO_4 0,1 g, $MgSO_4 + 7\ H_2O$ 0,1 g, $FeCl_3$ Spuren (BENECKE) hergestellt und in Petrischalen von 9 cm Durchmesser gegossen. Die Kulturen wurden in Lichtkästen mit drei Leuchtröhren (Philips TL 40 W 34) und Spiegeln an den Wänden nach HARTMANN aufgestellt, deren Beleuchtungsstärke etwa 2000 Lux betrug. Durch eine Schaltuhr kann das Licht in beliebigen Zeitabständen ein- und ausgeschaltet werden; wir gaben in unseren Versuchen 14 Std Licht und 10 Std Dunkelheit. Sobald die jungen Protonemen die ersten Stämmchen gebildet hatten, wurden sie auf Töpfe ausgepflanzt. Dazu wurden Töpfe zu $^3/_4$ mit grobem Sand und Kies gefüllt, dann mit einer 1—2 cm dicken Erdschicht bedeckt und sterilisiert. Diese Art der Kultur hat sich nach mehreren Vorversuchen als günstig erwiesen. Die so beschickten und bepflanzten Töpfe standen in den Nordgewächshäusern des Institutes, ein Teil auch in Frühbeetkästen an einer schattigen Stelle des Gartens.

Zur Regeneration wurden junge Sporogone, deren Kapsel noch nicht voll ausdifferenziert war, verwendet. Sie wurden in drei Teile zerschnitten, von denen der oberste etwa bis zur Kapselmitte reicht. Der mittlere umfaßt den daran anschließenden Teil der Kapsel bis zur Apophyse, der unterste die angeschnittene Apophyse mit dem darunterliegenden Setastück. Um die Sporogone von anklebenden Sporen und sonstigen Infektionskeimen zu befreien, wurden sie vor dem Zerschneiden mehrmals durch einen sterilisierten Agarnährboden gezogen. Eine Sterilisation der Sporophyten vor der Regeneration ist ohne weitgehende Schädigung des Regenerationsvermögens nicht möglich und mußte deshalb unterlassen werden. Durch die Reinigung und das Arbeiten unter sterilen Bedingungen können Pilz- und vor allem Bakterieninfektionen jedoch soweit vermieden werden, daß das Wachstum der Regenerationsprotonemen nicht behindert wird. Die aus den Schnittflächen der Sporogonstücke herauswachsenden Regenerationsprotonemen wurden später auf neue Nährböden übertragen. Die meisten wuchsen dort zu kräftigen Rasen mit Stämmchen heran, die dann, nachdem sie auf Erde gebracht worden waren, Geschlechtsorgane ausbildeten.

Terminologie. Die normalen haploiden Gametophyten mit den dazugehörigen diploiden Sporophyten werden als *univalens*-Rassen bezeichnet. Die apospor entstandenen diploiden Gametophyten mit ihren tetraploiden Sporophyten sind eine *bivalens*-Rasse.

Die Verteilung der Geschlechtsorgane bei den Bryophyten ist außerordentlich mannigfaltig ausgebildet. Für die verschiedenen Typen ist eine spezielle Terminologie eingeführt, die sich von der bei den Blütenpflanzen gebräuchlichen in einigen Fällen unterscheidet. Grundsätzlich wird zwischen Getrenntgeschlechtigkeit (Diözie) und Gemischtgeschlechtigkeit unterschieden. Bei der Gemischtgeschlechtigkeit sind mehrere Formen ausgebildet:

a) Rhizautözie: Voneinander getrennte weibliche und männliche Pflanzen entstehen am gleichen Protonema.

b) Autözie: Archegonien und Antheridien in verschiedenen Gametangienständen an voneinander getrennten Ästen eines Stämmchens.

c) Synözie oder Zwittrigkeit: Archegonien und Antheridien in einem Gametangienstand vereint.

d) Heterözie: Alle gemischtgeschlechtigen Verteilungstypen kommen im gleichen Rasen vor.

C. Untersuchungsergebnisse

I. Geschlechterverteilung der haploiden Gametophyten

Bryum capillare wird in allen Moosfloren als diözisch angegeben. DIXON (1924) beschreibt außer der typischen diözischen Form zusätzlich noch eine synözische.

Diese beiden Formen unterscheiden sich außer in der Geschlechterverteilung in keinem anderen Merkmal. É. und Ém. Marchal stellten für das von ihnen untersuchte *Bryum capillare* haplogenotypische Getrenntgeschlechtigkeit fest. Dabei geht aus je einer Spore ein weiblicher oder ein männlicher Gametophyt hervor, d. h., bereits die Spore ist sexuell determiniert und das Protonema sowie der Gametophyt sind streng unisexuell.

Zur nochmaligen Überprüfung der Geschlechterverteilung bei unserem *Bryum capillare* wurden Einsporkulturen angelegt. Die Ergebnisse einer Serie, die am 12. 3. 56 ausgesät wurde und bei der am 26. 8. bereits Antheridien- und Archegonienstände ausgebildet waren, finden sich in Tabelle 1.

Tabelle 1

12. 3. 56 ausgesäte Sporen	26. 8. 56 weiblich	26. 8. 56 männlich	26. 8. 56 ohne Gametangien	Nicht gekeimt
100	39	40	14	7

Alle Rasen waren streng eingeschlechtig. Faßt man alle Einsporkulturen, die zu verschiedenen Zeitpunkten ausgesät wurden, zusammen, so kamen bisher 225 Rasen zur Ausbildung von Gametangien. Davon hatten sich 111 rein weiblich und 114 rein männlich entwickelt. Das gefundene Verhältnis von weiblich zu männlich entspricht also dem bei genotypisch bedingter Geschlechterverteilung zu erwartenden Spaltungsverhältnis von 1:1.

II. Geschlechtsdimorphismus der haploiden Gametophyten

Die Getrenntgeschlechtigkeit kann sich schon morphologisch an der gesamten Haplophase — Spore, Protonema und Moosstämmchen mit den Gametangien — ausprägen, es handelt sich dann um einen ausgesprochenen sexuellen Dimorphismus, wie er bei Laubmoosen zuweilen zu beobachten ist.

In unseren Einsporkulturen von *Bryum capillare* war bereits zum Zeitpunkt der beginnenden Gametangienbildung an den Pflänzchen ein deutlicher Geschlechtsdimorphismus zu erkennen. Während Sporen und Protonema der männlichen und weiblichen Individuen gleichgestaltet sind, unterscheiden sich die Moosstämmchen eindeutig voneinander. Abb. 1 zeigt zum Vergleich eine weibliche und eine männliche gleichaltrige Pflanze nebeneinander.

Die weiblichen sind kräftiger und gedrungener; ihre lanzettlichen Blätter sind länger und stehen dichter gedrängt am Stämmchen. Die Archegonienstände sind schlank und knospenförmig und enthalten neben den 30—40 Archegonien nur wenige Paraphysen. Die Perichätialblätter sind lang und schmal, mit einer langen Spitze versehen (Abb. 2). Außerdem werden die Archegonien erst einen Monat nach den Antheridien angelegt.

Die männlichen Pflanzen sind viel zarter und schmaler als die weiblichen (Abb. 1). Sie tragen weniger locker gestellte Blätter an den Stämmchen. Das einzelne Blatt ist bei ihnen kürzer und im Verhältnis zur Länge breiter. Abb. 3, auf der ein weibliches und ein männliches Blatt einander gegenübergestellt sind, verdeutlicht diesen Unterschied. Der scheibenförmige Antheridienstand wird von breiten lanzettförmigen Perichätialblättern umhüllt (Abb. 4) und enthält im

Gegensatz zum Archegonienstand neben 50—60 Antheridien viele Paraphysen. Die ersten Antheridien entwickelten sich $3^1/_2$ Monate nach der Sporenaussaat, zu einer Zeit, in der noch keinerlei Archegonienanlagen auf den gleichaltrigen weiblichen Pflanzen zu beobachten sind.

Abb. 1. Haploides weibliches und männliches Moosstämmchen. Vergr. 1:5,25

Abb. 2. Haploide weibliche Perichätialblätter. Vergr. 1:13,3

Die Einsporkulturen haben also gezeigt, daß bei *Bryum capillare* die haplogenotypische Diözie mit einem Geschlechtsdimorphismus verbunden ist. Dieser kommt in der unterschiedlichen Gestaltung der Moosstämmchen beider Geschlechter zum Ausdruck und wird in den Organen, die den Geschlechtsorganen zeitlich und räumlich am nächsten kommen, immer eindeutiger.

Abb. 3. Haploides weibliches und männliches Blatt. Vergr. 1:13,3

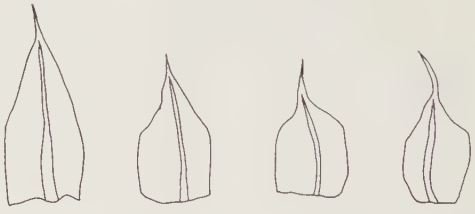


Abb. 4. Haploide männliche Perichätialblätter. Vergr. 1:13,3

III. Geschlechtsverteilung der diploiden Gametophyten

Bryum capillare ist eine Moosart mit guter Regenerationsfähigkeit des Sporophyten. In unseren Versuchen war in allen Fällen der Bereich der Kapselbasis am regenerationsfreudigsten, obwohl auch diploide Protonemen, allerdings in geringerer Zahl, aus Setastücken entstanden. Es wurden drei Regenerationsserien angesetzt, die in Tabelle 2 zusammengefaßt sind.

Von den diploiden Kulturen, die sehr viel langsamer wachsen als die haploiden, kamen nicht alle zur Ausbildung von Gametangien. Die Entwicklungsgeschwindigkeit wird außerdem

noch durch die Kulturmethode beeinflußt. Dieses Phänomen wird beim Vergleich der Serien vom Frühjahr (31. 3.) und Spätherbst (24. 11. und 12. 12.) besonders deutlich. Die Vorbehandlung bis zum Pikieren auf Erde war in allen Fällen die gleiche. Jedoch wurden die Töpfe der Frühjahrsserie nicht wie die der beiden anderen Versuche in die Nordgewächshäuser des Institutes gestellt, sondern befanden sich in Frühbeetkästen im Freien. Diese Rasen wuchsen sehr viel langsamer und hatten durchweg hellere Blättchen; auch bildeten sie, obwohl sie älter waren, erst später Sexualorgane aus.

Da bei der Untersuchung der bivalenten Gametophyten das Interesse der Geschlechtsausbildung galt, sind die anderen durch die Diploidie hervorgerufenen Veränderungen, soweit

Tabelle 2

Versuchsbeginn	Anzahl der ausgelegten Sporogene	Anzahl der Regenerationsprotonemen nach 1 Monat	Regenerationsprozentsatz
31. 3. 54	74	49	66%
24. 11. 54	128	32	25%
12. 12. 54	112	41	37%

sie nicht mit der Fragestellung in Zusammenhang stehen, nicht bearbeitet worden. Zusätzlich sei hier nur die bei allen bivalenten Rassen zu beobachtende allgemeine Vergrößerung sowie die starke Neigung zur Ausbildung von Verzweigungen erwähnt.

Bei den 30 Rasen, die zu dem Zeitpunkt, als sowohl Antheridien und Archegonien entwickelt waren, untersucht wurden, zeigte sich eine große Vielgestaltigkeit in der Geschlechterausbildung. Allen hier beobachteten Formen ist jedoch

Tabelle 3. *30 diploide Regenerationsrasen wurden untersucht*

Weibliche und männliche Pflänzchen am gleichen Protonema (rhizautözisch)	Weibliche, männliche und zwittrige Pflänzchen am gleichen Protonema (heterözisch)	Weibliche, männliche und zwittrige Pflänzchen mit Zwitterorganen am gleichen Protonema
5 (17%)	7 (23%)	18 (60%)

gemeinsam, daß sie eine wesentlich längere Zeit zur Gametangienausbildung benötigen als die *univalens*-Formen. Die ersten Gametangienstände, die immer ausschließlich Antheridien enthielten, wurden bei den Serien vom 24. 11. und 12. 12. 54 erst Mitte Januar 1956, also 13 Monate nach Beginn des Regenerationsexperimentes, aufgefunden. Die ersten Archegonienstände waren $1^1/_2$ Monate später, am 1. 3. 56, ausgebildet. Die Proterandrie der normalen haploiden Gametophyten bleibt hier also erhalten. Daß die Zeitspanne zwischen der Anlage beider Sexualorgane hier etwas größer ist als bei den Haploiden, mag wohl in der allgemein längeren Entwicklungsdauer der Diploiden begründet sein.

Für die *bivalens*-Rassen ist, da sie in sich männliche und weibliche Anlagen vereinen, Gemischtgeschlechtigkeit zu erwarten. In unserem Material ist die Geschlechterverteilung außerordentlich verschiedenartig ausgebildet. Eine Zusammenstellung der hauptsächlich gefundenen Typen ist in Tabelle 3 gegeben. In einigen Fällen geht die Bisexualität so weit, daß Zwischenbildungen von Archegonien und Antheridien entstehen, die wir als Zwitterorgane bezeichnen.

1. Regenerationsrasen mit rhizautözischer Geschlechterverteilung. Die in der ersten Gruppe zusammengefaßten 17% der untersuchten bivalenten Rasen

brachten am gleichen Regenerationsprotonema scharf voneinander getrennte männliche und weibliche Pflänzchen hervor. Die Gemischtgeschlechtigkeit äußerte

Abb. 5. Diploides weibliches und männliches Moosstämmchen. Vergr. 1:5,25

sich hier also als einwandfreie Rhizautözie: auf dem gleichen Protonema entstehen sexuell verschieden differenzierte Stämmchen. Die weiblichen und männlichen Pflänzchen sind auch jetzt dimorph ausgebildet; jedoch sind die Unterschiede, bezogen auf die Gesamtgestalt der Stämmchen, undeutlicher.

Abb. 5 zeigt zum Vergleich eine typische weibliche und eine männliche Pflanze vom gleichen Regenerationsrasen nebeneinander. Die weiblichen Pflänzchen zeichnen sich auch bei den Diploiden durch gedrungenen Bau und die gedrängte Insertion der Blätter am

Abb. 6. Diploides weibliches und männliches Blatt. Vergr. 1:13,3

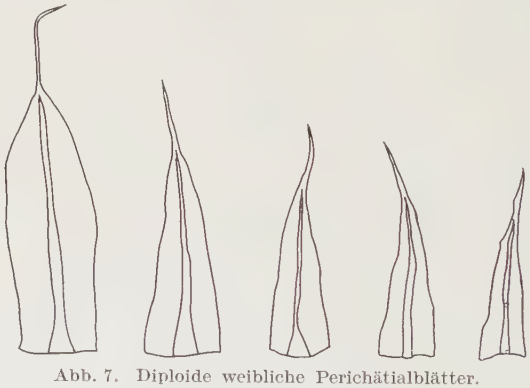


Abb. 7. Diploide weibliche Perichätialblätter. Vergr. 1:13,3

Stämmchen aus. Die Blätter, von denen ein typisches in Abb. 6 dargestellt ist, wiederholen den lanzettlichen Typ der Haploiden. Die Größenzunahme ist bei

ihnen lediglich auf eine starke Förderung des Längenwachstums zurückzuführen. Die Archegonienstände enthalten 70—80 große, normal ausgebildete Archegonien und werden von typisch weiblich gestalteten Perichätialblättern umhüllt, die gegenüber den Haploiden lediglich vergrößert und in der Hauptsache verbreitert sind (Abb. 7). Ob diese Größendifferenzen gegenüber den Haploiden auf eine Zellvergrößerung oder auf eine Zellvermehrung zurückzuführen sind, ist bisher nicht untersucht worden. Auch die Knospenform der Archegonienstände wird beibehalten. Die Anzahl der Paraphysen innerhalb eines diploiden Archegonienstandes ist entsprechend der Vermehrung der Archegonien erhöht, jedoch wird niemals die gleiche Menge erreicht wie in einem Antheridienstand.

Abb. 8. Diploide männliche Perichätialblätter. Vergr. 1:13,3

Die männlichen Stämmchen sind etwas schlanker als die weiblichen. Sie sind mit kleineren Blättern locker besetzt und enden mit einem scheibenförmigen Antheridienstand, der im allgemeinen 60—80, zuweilen aber auch über 100 Antheridien enthält. Die diploiden Antheridien sind größer als die haploiden und normal gebaut. Bei leichtem Druck auf die Antheridien öffnen sich diese und der die Spermatozoiden enthaltende Gallertkörper tritt aus, doch zeigen die diploiden Spermatozoiden keine Motilität und sind deshalb befruchtungsunfähig. Die Laubblätter (Abb. 6) weichen in ihrer Form von dem männlichen Typ der Haploiden ab und entsprechen gestaltlich in der nunmehr lanzettlichen Form den weiblichen. Die Perichätialblätter indessen (Abb. 8) sind wieder typisch männlich gestaltet, nur sind sie vergrößert und haben auffallend verlängerte Spitzen.

Häufig sind bei den *bivalens*-Rassen die Stämmchen verzweigt und tragen an ihren Spitzen noch einmal Gametangien. Bei den eben beschriebenen Formen sind die Nebenäste genauso ausgebildet wie das Hauptstämmchen. Am gleichen Pflänzchen werden in den Gametangienständen der Verzweigungen, allerdings in verminderter Zahl, immer nur die gleichen Geschlechtsorgane ausgebildet, die auch am Hauptgametangienstand vorkommen. Die Rasen wurden dreimal hintereinander in monatlichen Abständen daraufhin geprüft, ob sich nicht doch noch zwittrige Gametangienstände entwickelt hätten. Die Untersuchungen zeigten aber jedesmal dasselbe: am gleichen Rasen entstehen rein weibliche und männliche Stämmchen, die auch in ihren Nebenästen konstant die gleichen Geschlechtsorgane ausbilden.

In der Verteilung von weiblichen und männlichen Stämmchen auf den gesamten Rasen herrschen insofern bestimmte Gesetzmäßigkeiten, als die gleichgeschlechtigen Pflänzchen immer beisammenstehen. Eine Durchmischung konnte

nur in den Übergangszonen beobachtet werden. In vier Fällen waren die weiblichen Pflänzchen in der Mitte des Topfes konzentriert und die männlichen nur am Rande. Nur einmal lagen die Verhältnisse gerade umgekehrt. Der prozentuale Anteil der beiden Geschlechter an den Rasen schwankt und wird gegen Ende der Entwicklungszeit zugunsten der weiblichen Stämmchen verschoben. Diese Verschiebung ist wohl als Folgeerscheinung der Proterandrie anzusehen.

2. Regenerationsrasen mit heterözischer Geschlechterverteilung. Die Verteilungsverhältnisse der Sexualorgane sind

Abb. 9. Diploides Moosstämmchen mit zwittrigem Gametangienstand. Vergr. 1:5,25

Abb. 10. Antheridium mit kurzem Archegonhals und Krönchen. Vergr. 1:133

bei den heterözischen Regenerationskulturen, die 23% des untersuchten Materials ausmachten, bezogen auf die vorige Gruppe, stark abgewandelt. Auf dem gleichen Rasen kommen hier neben den oben beschriebenen getrenntgeschlechtigen Pflänzchen zusätzlich Stämmchen mit synözischer und autözischer Geschlechterverteilung vor. Bei den synözischen Pflanzen, die Antheridien und Archegonien innerhalb derselben Hüllblätter enthalten, überwiegt der männliche Anteil. Im Wuchs und in der Blattform ähneln sie den männlichen diploiden Pflanzen stark und sind meistens ohne genauere Untersuchung von diesen nicht zu unterscheiden (Abb. 9). Die Perichätialblätter des scheibenförmigen Gametangienstandes stimmen mit dem männlichen Typ gut überein. Auch die große Anzahl der Paraphysen charakterisiert diese Pflänzchen als vorherrschend männlich. Die Anteile der Sexualorgane sind im typischen Fall 70 Antheridien zu 3 Archegonien, jedoch sind die Schwankungen sehr groß. Entwicklungsgeschichtlich werden die Archegonien später angelegt und stehen immer an der Peripherie des discoidalen Gametangienstandes. Die Seitenäste dieser Pflänzchen

zeigen abgeschwächt die gleichen Verhältnisse. Lediglich das Verhältnis Antheridien zu Archegonien ist etwas mehr zur weiblichen Seite verschoben.

Die autözische Geschlechterverteilung, bei der weibliche und männliche Gametangienstände an verschiedenen Ästen eines Stämmchens stehen, ist in unserem Material im allgemeinen so ausgebildet, daß zunächst der terminal stehende Antheridienstand entsteht. Die sich später entwickelnden Archegonienstände befinden sich dann an den lateralen Ästen. Zuweilen entstehen auch zwei bis drei Antheridienstände und später zwei Archegonienstände. Diese Pflänzchen sehen ebenso aus wie die synözischen, sie neigen also zum diploiden männlichen Typus hin.

Am häufigsten wurde in den heterözischen Kulturen eine Mischung zwischen synözischer und autözischer Verteilung gefunden. Der terminale Gametangienstand ist dabei rein männlich, der sich später entwickelnde vorherrschend männlich mit nur einigen Archegonien. Die am spätesten angelegten sind dann meistens rein weiblich. Die Tendenz, zuerst männliche Sexualorgane und späterhin weibliche anzulegen, wird in jedem Fall beibehalten. Ihr Vorherrschen prägt sich ebenfalls in der Gesamtgestalt, die auch bei diesen Pflänzchen immer männlich ist, aus.

Die Verteilung der beschriebenen Pflänzchen auf den ganzen Rasen ist sehr variabel. Auch hier stehen die eingeschlechtig ausgebildeten Stämmchen, die immer vorhanden sind, häufig beisammen. Alle anderen Formen sind jedoch stark durchmischt und lassen keinerlei Gesetzmäßigkeit in ihrer Anordnung erkennen.

3. Regenerationsrasen mit Zwitterorganen. Bei der weitaus größten Menge der beobachteten bivalenten Rasen manifestiert sich die Gemischtgeschlechtigkeit nicht nur in der Verteilungsweise der Sexualorgane, sondern sie erstreckt sich auch auf deren Ausbildung selbst. Neben Mißbildungen in den Antheridien und Archegonien selbst entstehen auch ausgesprochene Zwischenbildungen zwischen beiden. Diese Zwitterorgane sind nun außerordentlich verschieden gestaltet. Einmal sind sie stark antheridial ausgebildet, das andere Mal ist der Archegoniencharakter stärker hervorgehoben.

In Abb. 10 ist ein solches Zwitterorgan von vorwiegend antheridialem Bau dargestellt. Der dem Stiel aufsitzende Teil ist wie ein Antheridium gebaut und enthält auch spermatogenes Gewebe; jedoch verjüngt es sich dann in einen Archegonhals mit Halskanalzellen und einem Krönchen. Diese Form tritt recht häufig auf, doch schwankt die Länge des Halses sehr. Er kann kürzer oder länger als auf der Abbildung sein. Sehr viel stärker an ein normales Archegonium erinnert das Zwitterorgan in Abb. 11. In dem unteren, der Eihöhle eines normalen Archegoniums entsprechenden Teil, ist eine Eizelle neben Antheridiengewebe vorhanden. Das ganze Gebilde endet dann wieder in einem wenigzelligen Hals. Zuweilen wurden kleine, morphologisch annähernd normal aussehende Archegonien gefunden, deren Bauchteil einen Komplex von spermatogenem Gewebe enthält (Abb. 12). Einen andersartigen, ebenfalls häufig vorkommenden Typ von Zwitterorganen zeigt Abb. 13. Hier stehen etagenartig ein morphologisch antheridienähnlicher Körper und ein verkürztes Archegonium übereinander. Das ganze Gebilde enthält aber nur Antheridiengewebe. Abb. 14 zeigt ein junges Zwitterorgan, das von einer typischen Antheridienwandschicht umgeben ist. In

dem unteren Teil ist eine Eizelle sowie die dazugehörige Bauchkanalzelle mit einer doppelten Halskanalzellreihe ausgebildet, im oberen Teil dagegen ausgesprochenes Antheridiengewebe. Die Beispiele für Zwitterorgane ließen sich an Hand der gefundenen Formen beliebig vermehren, doch sollten hier nur die häufigsten Typen aufgezeigt werden. Allen ist ja gemeinsam, daß im Laufe ihrer Entwicklungsgeschichte keine endgültige Determination zu einem harmonisch gestalteten Organ stattfindet.

Auch an den aus eingeschlechtig differenzierten Zellen aufgebauten Sexualorganen kommen Mißbildungen vor. So kann die Anzahl der einzelnen Organteile eines Archegoniums vervielfältigt sein. Es

Abb. 11. Archegoniumähnliches Zwitterorgan. Vergr. 1:133

Abb. 12. Archegonium mit spermatogenem Gewebe. Vergr. 1:133

entstehen Organe mit mehreren Ei- oder Bauchkanalzellen, oder solche, bei denen kein Ei ausgebildet wird, dafür aber der Anteil der Halskanalzellen vermehrt ist. Auch die Antheridien können anormal ausgebildet sein. Eine häufige, morphologisch jedoch nicht in Erscheinung tretende Mißbildung ist das Unvermögen dieser Organe, sich zu öffnen. Man findet vollkommen reife Antheridien, deren Spermatozoidenmasse sich braun färbt und nicht austreten kann. Bei den meisten anderen Abnormitäten ist der Anteil mit dem spermatogenen Gewebe mehr oder weniger stark reduziert, wobei es häufig zu Deformationen des Antheridiums kommt.

In unseren diploiden Regenerationsrasen wurden in einigen Fällen auch Pflänzchen mit Mischbildungen zwischen Blättern und Sexualorganen gefunden. Sie stammten aus Kulturen, die neben durchaus normalen auch Pflänzchen mit monströsen Blättern trugen. An den Stämmchen befanden sich dann neben anderen, von der normalen Form abweichenden Blättern auch solche, deren Rippe an der Blattspitze stark angeschwollen war und in einem drehrunden Gebilde endete. An der Spitze solcher Rippen ist eine zweischneidige Scheitelzelle aus-

gebildet. Abb. 15 zeigt ein solches Blatt mit doppelter Rippe und ihren angeschwollenen Enden, die als junge Archegonanlagen zu deuten sind. Diese werden aus den lang zugespitzten Zellen der Rippe, die dann ihren Charakter verlieren, gebildet. Je näher die Blätter an die „Blütenregion" rücken, desto deutlicher wird der Archegoniencharakter an der Blattspitze. Abb. 16 zeigt ein Perichätialblatt, bei dem das aufsitzende Archegonium fast vollkommen ausgebildet ist.

Abb. 13.

Abb. 14.

Abb. 15.

Abb. 13. Doppelbildung von Archegonium und Antheridium. Vergr. 1:100
Abb. 14. Zwitterorgan mit Antheridien- und Archegoniengewebe. Vergr. 1:200
Abb. 15. Blatt mit jungen Archegonienanlagen an den Rippenenden. Vergr. 1:17,5

Auffallend ist, daß diese sexualisierten Blätter nur in der Nähe des Gametangienstandes auftreten. Die weiter unten am Stämmchen inserierten Blätter waren zwar auch monströs ausgebildet, die Abweichungen äußerten sich aber in vervielfachten Rippen und zerlappten Blattspreiten. Direkt im Gametangienstand eines anderen bivalenten Rasens standen archegonien- und antheridienartige Organe mit Blattspitzen (Abb. 17). Bei diesen Mosaikbildungen liegt das Hauptgewicht auf der Sexualorganbildung, die dann später in eine blattartige Entwicklung umschlägt.

Von Bedeutung ist noch die Frage nach der Verteilung der Pflänzchen mit Zwitterbildungen auf die Regenerationsrasen. In den betreffenden Kulturen kamen neben normal entwickelten eingeschlechtigen, zwittrigen und sterilen Pflanzen auch solche vor, die in wechselnder Ausprägung und Anzahl monströse Blätter ausgebildet hatten. Auffallend war, daß meistens, aber nicht immer,

Pflänzchen mit solchen Blättern bevorzugt die beschriebenen Zwitterorgane trugen. Meistens entsprachen diese Moosstämmchen rein äußerlich dem weiblichen Typus. Auch in den Gametangienständen mit Zwitterorganen, die immer mit normal ausgebildeten Sexualorganen vermischt stehen, dominierten in vielen Fällen die Archegonien zahlenmäßig.

Fassen wir alle 30 untersuchten diploiden Regenerationskulturen zusammen, so ist ihnen allen die Gamosterilität gemeinsam. Denn auch in den normalen bivalenten Rasen wurden bis jetzt noch keine jungen Sporogone gefunden. Die Geschlechtsdifferenzierung in den diploiden bisexuellen Gametophyten erfolgt im Laufe der Entwicklungsgeschichte zu sehr verschiedenen Zeitpunkten und führt zu einer außerordentlich variablen Verteilung von Archegonien und Antheridien.

Abb. 16. Perichätialblatt mit aufsitzendem Archegonium. Vergr. 1:92

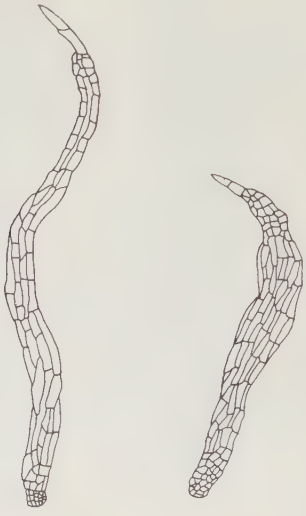


Abb. 17. Archegonien- und antheridienartiges Organ mit Blattspitze. Vergr. 1:66,6

D. Diskussion

I. Geschlechterverteilung der haploiden Gametophyten

Bei *Bryum capillare* L. konnte durch Einsporkulturen gezeigt werden, daß aus je einer Spore sich entweder ein rein weiblicher oder ein rein männlicher Gametophyt entwickelt. Hierdurch ist die haplogenotypisch bestimmte Getrenntgeschlechtigkeit bei *Bryum capillare* erwiesen. Es fragt sich nun, liegt der Getrenntgeschlechtigkeit ein entsprechender X-Y-Mechanismus von Geschlechtschromosomen zugrunde? Die Meiosis von *Bryum capillare* wurde unter diesem Gesichtspunkt von JACHIMSKY (1935) untersucht. Er fand in einigen Fällen geringe Größenunterschiede zwischen den Partnern eines Bivalentes und sieht darin einen Anhaltspunkt für das Vorhandensein von Geschlechtschromosomen mit X-Y-Mechanismus. Eine sichere Entscheidung war jedoch bei den außerordentlich geringen Differenzen nicht möglich. Auch STEERE (1954) findet bei seinen Untersuchungen keine Chromosomen, die mit Sicherheit als Geschlechtschromosomen anzusehen sind. Chromosomenmorphologisch

ist über den Mechanismus der Geschlechtsdifferenzierung aus Gründen der schwierigen cytologischen Analyse nichts auszusagen. Daß aber ein dem X-Y-Mechanismus funktionell entsprechendes Verhalten vorliegt, wird durch die Aufspaltung der Gametophyten deutlich. Sie entspricht in unseren Versuchen an Einsporkulturen dem bei Haplonten zu erwartenden Spaltungsverhältnis von 1:1.

II. Geschlechtsdimorphismus der haploiden Gametophyten

Bei einigen Laubmoosen ist mit der Diözie ein ausgesprochener Geschlechtsdimorphismus verbunden. Grad und Ausprägung dieses Phänomens können sehr verschieden sein. Am deutlichsten ist der Geschlechtsdimorphismus, wie Untersuchungen von Ernst-Schwarzenbach (1939) zeigen, bei verschiedenen heterosporen *Makromitrium*-Arten, die Zwergmännchen und große, kräftig ausgebildete und vegetativ weiterwachsende Gametophyten besitzen. Hier ist tatsächlich die gesamte Haplophase, je nachdem, ob es sich um männliche oder weibliche Individuen handelt, schon von der Spore an verschieden gestaltet. Bei anderen Laubmoosen, wie *Splachnum sphaericum* (Schweizer 1923, Bornhagen 1930), bei *Leucobryum glaucum* (Woesler 1935), sowie bei *Buxbaumia aphylla* (Dening 1935/36) sind ebenfalls sekundäre Geschlechtsmerkmale aufgezeigt worden. In diesen Fällen sind jedoch die Sporen und Protonemen beider Geschlechter gleichgestaltet und nur im Aufbau des Moospflänzchens lassen sich zwischen männlichen und weiblichen Individuen Unterschiede nachweisen. Es handelt sich hierbei immer um echte genotypisch bedingte Diözie, wie durch Einsporkulturen jeweils gezeigt werden konnte. Sexueller Dimorphismus kann im übrigen auch phänotypisch bedingt sein. Es entstehen dann auf dem Protonema einer einzigen Spore morphologisch verschiedene männliche und weibliche Stämmchen, wie es Bornhagen (1930) für *Splachnum ampullaceum* L. zeigte.

Bei dem haplodiözischen *Bryum capillare* erstreckt sich die Ausbildung der sekundären Geschlechtsmerkmale nicht auf die gesamte Haplophase, sondern lediglich, wie bei den meisten daraufhin untersuchten Moosen, auf das Moosstämmchen. Sie werden also entwicklungsgeschichtlich verhältnismäßig spät ausdifferenziert. Diese Tatsache zeigt sich auch darin, daß in der unmittelbaren Umgebung des Ausbildungsortes der Sexualorgane die morphologischen Differenzen sehr viel deutlicher hervortreten.

III. Geschlechterverteilung der diploiden Gametophyten

Bereits É. und Ém. Marchal (1907) haben durch Regeneration von Sporogonen haplodiözischer Moose bivalente Rassen erhalten und deren Geschlechterverteilung untersucht. Ihre hauptsächliche Versuchspflanze war neben *Bryum argenteum* und *Mnium hornum*, *Bryum caespiticium*. Sie fanden, daß die bivalenten Rassen, bei denen im Gametophyten männliche und weibliche Anlagen vereint sind, den entwicklungsphysiologischen Vorstellungen entsprechend gemischtgeschlechtig waren. v. Wettstein (1924) bearbeitete die Frage nach der Geschlechtsausbildung bei polyploiden Rassen ebenfalls an *Bryum caespiticium* und kam im wesentlichen zu den gleichen Ergebnissen wie Marchals: Bei *Bryum caespiticium* ist die Gemischtgeschlechtigkeit in der Form ausgebildet, daß der männliche Anteil bei der Gametangienausbildung stärker und früher in Erscheinung tritt. Sehr mannigfaltige Verhältnisse fand auch Schweizer (1923) bei bivalenten Rassen von *Splachnum sphaericum*. Bei diesen kommen hauptsächlich getrennte weibliche und männliche Pflänzchen im gleichen Ausgangsrasen vor. Außerdem beobachtete Schweizer monströse weibliche und männliche Rasen, die völlig unisexuell waren und auch in ihren vegetativen Nachkommen ebenso erhalten blieben. Bornhagen (1930), die ebenfalls bivalente Regenerate von *Splachnum*

sphaericum erhielt, fand in ihrem Material nur den unisexuellen weiblichen Typ, was jedoch mit der Kleinheit dieser Versuchsserien zusammenhängen mag. Ebenfalls rein unisexuelle Gametophyten fand ARENS (1939) bei diploiden Regeneraten des haplodiözischen *Splachnum vasculosum*. Die diploiden Pflänzchen entwickelten ausschließlich Archegonien, jedoch trat die männliche Tendenz in der Ausbildung der Perichätialblätter hervor. Ebenfalls unisexuell, jedoch rein männlich, waren die *bivalens*-Rassen von *Eurhychnium Stokesii* von MOUTSCHEN (1954), der auch nach Änderung der Kulturbedingungen keine Archegonien finden konnte.

Der bei *Bryum capillare* aufgezeigte Geschlechtsdimorphismus erlaubt es, an den diploiden bisexuellen Regenerationsgametophyten nicht nur die Ausbildung und Verteilung der Geschlechtsorgane selbst, sondern auch die damit verbundenen formativen Anlagen zu analysieren. An den diploiden Rasen konnten wir eine anscheinend regellose Mannigfaltigkeit der sexuellen Differenzierung, wie sie bei anderen bivalenten Laubmoosen bisher nicht beobachtet wurde, aufzeigen. Es waren zwar alle apospor entstandenen Rasen gemischtgeschlechtig, jedoch ist die Form der endgültigen Verteilung vom Zeitpunkt der sexuellen Differenzierung abhängig. Die entwicklungsgeschichtlich früheste Determination finden wir in den Fällen, in denen bei der Knospenbildung am Protonema männliche und weibliche Pflänzchen getrennt angelegt werden. Diese Differenzierung geht über die Ausbildung der Gametangien hinaus, denn sie läßt, allerdings in abgeschwächtem Maße, die sekundären Geschlechtsmerkmale noch erkennen. Die Verteilung der Geschlechtsorgane auf verschiedene Stämmchen entspricht genau den von SCHWEIZER (1924) bei bivalenten Rassen von *Splachnum sphaericum* hauptsächlich aufgefundenen Verhältnissen.

Die nächste Verschiebung des Determinationszeitpunktes finden wir, wenn, wie bei den diploiden Rassen von *Bryum caespiticium*, an dem durchaus männlich ausgebildeten Stämmchen die später entstehenden Äste zunehmend weiblicher werden. Für das Zustandekommen von Archegonien und den spezifisch weiblichen Perichätialblättern scheint eine längere und vollständigere Entwicklung des Stämmchens Voraussetzung zu sein. Für diese Annahme spricht ebenfalls, daß in den Fällen, in denen bereits der zuerst angelegte Gametangienstand zwittrig ist, die Archegonien sich später als die Antheridien entwickeln. Die sich schneller ausbildende männliche Tendenz prägt sich auch in den sekundären Geschlechtsmerkmalen aus; denn die zwittrigen Stämmchen entsprechen dem männlichen Typ.

IV. Zwitterorgane

Zwitterorgane sind schon des öfteren bei verschiedenen Laubmoosen beschrieben worden. Zumeist fanden sich solche Mosaikbildungen bei monözischen Formen, wie z. B. *Mnium cuspidatum* (HOLFERTY 1904) und *Atrichum undulatum* (HY 1884). Doch fand LINDBERG (1879) Zwitterorgane bei dem als diözisch erkannten *Brachythecium erythrorrhizon* und später BERGEVIN (1902) bei *Plagiothecium sylvaticum*. WILSON (1915), der ebenfalls bei dem diözischen *Mnium hornum* solche Organe entdeckte, vermutete diploide Formen vor sich zu haben. Cytologische Untersuchungen zeigten aber die normale haploide Chromosomenzahl seiner Versuchspflanzen. Auch bei dem haplodiözischen *Bryum caespiticium* fand v. WETTSTEIN (1942) Zwischenbildungen von Antheridien und Archegonien. Zunächst konnte v. WETTSTEIN zeigen, daß durch einen seltenen Realisatorenaustausch zwittrige und agame Individuen entstanden. Die Störungen in der Normalentwicklung erklärt er dann durch das unausgeglichene Verhältnis der Realisatorenmenge zur übrigen Genommenge. Für unser diploides *Bryum capillare* treffen diese Vorstellungen jedoch nicht zu. Denn das Verhältnis der Realisatoren zum übrigen Genom ist das gleiche geblieben. Doch scheint hier der diploide Zustand mit der Anwesenheit beider Realisatoren noch so wenig ausbalanciert zu sein, daß

es zu keiner festgelegten Reaktion kommt. Das gleiche Phänomen an einwandfrei diploiden Moosen fanden bisher nur É. und Ém. Marchal (1909). In ihren Regenerationsrasen von *Bryum caespiticium* und *Mnium hornum* konnten sie ganz vereinzelt solche Zwischenbildungen beobachten.

In unseren bivalenten Rasen von *Bryum capillare* sind solche Organe im Gegensatz dazu sehr häufig gefunden worden. Dabei ist auffallend, daß bei den Moosstämmchen, die neben normalen Gametangien auch Zwitterorgane hervorbringen, die weiblichen Merkmale in der Gestalt viel stärker zum Vorschein kommen. In solchen Gametangienständen sind auch die normalen Archegonien sehr viel zahlreicher als die normalen Antheridien. Diese Stämmchen scheinen am bisexuellen Protonema zunächst weiblich angelegt zu werden. Doch ist der Schritt zur weiblichen Ausbildung nicht vollkommen, sondern die stärkere männliche Tendenz greift in den Entwicklungsgang ein und führt zu Störungen, die sich in Organmißbildungen äußern. Daß hier aber das Zusammenspiel von männlichen und weiblichen Tendenzen nicht nur die Ausbildung der Sexualorgane selbst beeinflußt, zeigen die Zwischenformen von Sexualorganen und Blättern. Die Labilität in der Entwicklung erstreckt sich auch auf funktionell verschiedene Organe. Dabei ist hervorzuheben, daß solche Zwischenbildungen aber erst in einem bestimmten „blühfähigen" Zustand auftreten. Einen ersten Hinweis über das Zusammenwirken des noch wenig ausbalancierten diploiden Zustandes mit den Außenbedingungen geben einige Befunde an unseren bivalenten Rassen. Es zeigte sich nämlich, daß bei den Kulturen, die in Frühbeetkästen im Freien gestanden hatten, kaum Störungen in der Ausbildung der Sexualorgane zu finden waren. Diese Rassen wuchsen außerordentlich langsam und konnten sich deshalb harmonisch entwickeln.

Es ist interessant, daß Moutschen (1954) ähnliche Störungen in der Sexualorganentwicklung bei *Brachythecium rutabulum* nach Röntgenbestrahlung von beblätterten Moosstämmchen gefunden hat. Ob es sich in diesen Fällen um echte Mutationen handelt, oder ob die Organe, die während ihrer Entwicklung bestrahlt wurden, durch diesen Eingriff so stark in ihrer Normalentwicklung gestört wurden, ist von Moutschen nicht analysiert worden. Doch liegen in dem als Metaplasie beschriebenen Fall, bei dem Archegonanlagen in Blätter umschlagen, sicher Radiomorphosen vor. Es ist also die Bildung von Zwitterorganen, die bei verschiedenen Laubmoosen sehr ähnlich gestaltet sind, in den Fällen, in denen sie analysiert werden konnten, auf ganz verschiedene Ursachen zurückzuführen.

Zusammenfassung

1. Bei *Bryum capillare* L. wurde an Hand von Einsporkulturen haplogenotypisch bedingte Diözie nachgewiesen.

2. Die Diözie ist in bezug auf das Moosstämmchen mit einem ausgesprochenen Geschlechtsdimorphismus verbunden.

3. Die Geschlechterverteilung bei durch Regeneration der Sporogone entstandenen diploiden bisexuellen Rassen wurde untersucht. Dabei ergaben sich bei den einzelnen Kulturen verschiedene Verteilungstypen:

a) Am gleichen Protonema werden voneinander getrennte männliche und weibliche Stämmchen ausgebildet.

b) Zusätzlich dazu werden zwittrige Gametangienstände entwickelt.

c) Neben diesen beiden normalen Ausbildungen kommen Zwitterorgane und Zwischenformen von Sexualorganen und Blättern in den Gametangienständen vor.

Literatur

Arens, P.: Die Geschlechterverteilung bei einigen Splachnaceen. Ber. dtsch. bot. Ges. **57**, 486—494 (1939). — Bergevin, E. de: Interversion dans la croissance des organes sexuels du *Plagiothecium sylvaticum* L. Rev. Bryol. **1902**, 115 - 119; Ref. Bot. Zbl. **92**, 56 (1903). — Bornhagen, H.: Geschlechtsverteilung und Geschlechtsdimorphismus bei *Splachnum ampullaceum* L. und *Splachnum sphaericum* (L. f.) Swartz. Beih. Bot. Zbl. **1**, 46, 407—434 (1930). — Dening, K.: Untersuchungen über sexuellen Dimorphismus der Gametophyten bei heterothallischen Laubmoosen. Flora (Jena) **30**, 57—86 (1935/36). — Dixon, H. N.: The students handbook of British mosses, 3. Aufl. London 1924. — Ernst-Schwarzenbach, M.: Zur Kenntnis des sexuellen Dimorphismus der Laubmoose. Arch. Klaus-Stiftg **14**, 361—474 (1939). — Holferty, G. M.: The development of the archegonium of *Mnium cuspidatum*. Bot. Gaz. **37**, 106—126 (1904). — Jachimsky, H.: Beitrag zur Kenntnis von Geschlechtschromosomen und Heterochromatin bei Moosen. Jb. wiss. Bot. **81**, 203—238 (1935). — Limpricht, K. G.: Die Laubmoose Deutschlands, Österreichs und der Schweiz. In Rabenhorsts Kryptogamen-Flora, Bd. IV, Abt. 2. 1895—1904. — Lindberg, S. O.: Übergang weiblicher Organe zu männlichen bei einem Blattmoos. Öfvers. Kgl. Svensk. Vetensk. Akad. Förh. Ref. Justs bot. Jber. **8**, Abt. 1 (1880). — Marchal, É. et Ém.: Recherches experimentales sur la sexualité des spores chez les mousses dioiques. Mém. Acad. roy. Belg., Ser. II, Cl. Sci. **1**, 50 S. (1904/06). — Aposporie et sexualité chez les mousses. I. Bull. Acad. roy. Belg., Cl. Sci. **7**, 763, 789 (1907). — Aposporie et sexualité chez les mousses. II. Bull. Acad. roy. Belg., Cl. Sci. **12**, 1247—1288 (1909). — Aposporie et sexualité chez les mousses. III. Bull. Acad. roy. Belg., Cl. Sci. **9/10**, 748—778 (1911). — Mönkemeyer, W.: Erg.-Bd. IV zu Rabenhorsts Kryptogamen-Flora. 1927. — Moutschen, J.: Quelques considerations sur l'aposporie chez les mousses. VIII. Congr. internat. Bot. Sec. **16**, S. 114 bis 121, 1954. — Contribution à l'étude de la génétiques des mousses. Action des rayons X et de rayons gamma. Cellule **56**, 181—208 (1954). — Schweizer, J.: Polyploidie und Geschlechtsverteilung bei *Splachnum sphaericum* (L. f.) Swartz. Flora N. F. **116**, 1—72 (1923). — Steere, W. C., L. E. Anderson and V. S. Bryan: Chromosome studies on California mosses. Mem. Torrey Bot. Club **20**, Nr 4, 1—75 (1954). — Wettstein, F. v.: Morphologie und Physiologie des Formwechsels der Moose. I. Z. Vererbungslehre **33**, 1—236 (1924). — Über einige Beobachtungen und experimentelle Befunde bei Laubmoosen. Ber. dtsch. bot. Ges. **60**, 394—414 (1942). — Wilson, M.: Sex determination in *Mnium hornum*. Ann. of Bot. **29**, 433—440 (1915). — Woesler, A.: Zur Zwergmännchenfrage bei *Leucobryum glaucum* Schpr. I. Planta (Berl.) **24**, 1—13 (1935).

Dr. Anita Hoffmann, Freiburg i. Br., Botanisches Institut der Universität, Schänzlestr. 9

Zeitschrift für indukt. Abstammungs- und Vererbungslehre, Bd. 87, S. 769–783 (1956)

Aus dem Max-Planck-Institut für Biologie, Abt. Kühn, Tübingen

DIE FLUORESZIERENDEN STOFFE IN DEN ORGANEN DREIER GENOTYPEN VON *EPHESTIA KÜHNIELLA*

BEITRAG ZUR ANALYSE VON GENWIRKUNGEN IN PTERIN- UND TRYPTOPHANSTOFFWECHSEL

Von

Albrecht Egelhaaf

Mit 3 Textabbildungen

(Eingegangen am 3. September 1956)

Einleitung

Die Bestandsaufnahme fluoreszierender Stoffe bei verschiedenen Genotypen von *Drosophila* (Hadorn und Mitchell 1951, Buzatti-Traverso 1953, Goldschmidt 1954, Danneel und Zimmermann 1954) und *Ephestia* (Hadorn und Kühn 1953, Hadorn und Egelhaaf 1956) erschloß der genetischen Analyse eine leicht darstellbare Merkmalsgruppe, deren Vertreter in zahlreichen qualitativ und quantitativ abgewandelten Kombinationen genabhängige Fluoreszenzmuster bilden.

Die zunächst willkürlich erscheinende Stoffauswahl erfuhr durch die fortschreitende Identifizierung der Substanzen eine Beschränkung auf im wesentlichen zwei Gruppen: auf Pteridin- (Forrest und Mitchell 1954; Viscontini, Schoeller, Loeser, Karrer und Hadorn 1955; Viscontini, Loeser, Karrer und Hadorn 1955, 2. und 3. Mitteilung; Viscontini, Kühn und Egelhaaf 1956) und Tryptophan-Derivate (Danneel und Zimmermann 1954). Zahlreiche Mutationen greifen in den Stoffwechsel der einen oder anderen Gruppe oder — durch bisher noch ungeklärte polyphäne Verknüpfung — auch in beide ein (Kühn und Egelhaaf 1955, Kühn 1956).

Bei *Ephestia* verändert die Mutation *bch* im Auge tiefgreifend den Pteringehalt; an Stelle der bei bch^+ zahlreich vorhandenen Stoffe (c_1, Xanthopterin, k_2, Isoxanthopterin und 2-Amino-6-oxypteridin) bleiben nur noch die beiden letzteren — und zwar in höherer Konzentration — übrig. Die Mutation $a^+ \rightarrow a$, durch welche die Bildung von Kynurenin aus Tryptophan und damit die Ommochromsynthese unterbunden wird (Zusammenfassung Butenandt 1953, Kühn 1956), modifiziert das bch^+-Muster quantitativ im Sinne einer Verstärkung der Substanz c_1; bei *bch* äußert sie sich im Hinzukommen eines hellblau fluoreszierenden Stoffes (c_2?, Kühn und Berg 1955).

Im Abdomen wurde eine weitgehende qualitative und quantitative Übereinstimmung zwischen dem a^+- und *bch*-Muster gefunden, während *a* ärmer an Stoffen ist. Das Auge reagiert also abweichend vom übrigen Körper in spezifischer Weise auf die genannten Mutationen (Hadorn und Egelhaaf 1956).

Die Untersuchung der einzelnen Abdominalorgane von *Ephestia* (in Fortsetzung der zuletzt zitierten Arbeit) auf ihren Gehalt an fluoreszierenden Stoffen gilt der Frage, ob sich für jeden einzelnen Genotypus ein gemeinsames, für alle Körperteile „verbindliches" Fluoreszenzmuster finden läßt, das eine gleichsinnige

Beeinflussung des Stoffwechsels anzeigt, und inwieweit organspezifische Abweichungen davon vorkommen, und ferner der Frage, ob gewisse Verbindungen auf einzelne Körperteile beschränkt sind, und ob ihr Vorkommen Schlüsse auf ihre physiologische Rolle gestattet.

Die vorliegende Arbeit stützt sich auf die papierchromatographische Isolierung und fluorometrische Bestimmung der Stoffe. Ihre Lokalisation im Gewebe soll einer weiteren Untersuchung vorbehalten bleiben.

Material und Methodik

Folgende Stämme unserer Institutszuchten von *Ephestia kühniella* wurden verwendet:

1. Von der dunkeläugigen Wildform (a^+/a^+; bch^+/bch^+) die Flügelmustermutanten *Bk 19*, *Sb*, *K 24 Sy* und *b hell*.
2. Von der rotäugigen Mutante (a/a; bch^+/bch^+) verschiedene Inzuchtstämme.
3. Die Mutante *bch* (a^+/a^+; bch/bch).

Zur chromatographischen Aufarbeitung dienten Imagines im Alter von 1—2 Tagen. Jeder Bestimmung lag eine größere Anzahl von Organen oder ganzen Abdomen zugrunde (Tabelle 1).

Tabelle 1. *Anzahl der für eine Bestimmung aufgearbeiteten Abdomen bzw. Organe und Anzahl (n) der quantitativen Bestimmungen.* Die in () stehenden Bestimmungen wurden von nur je 150 Eiern gewonnen

		Abdomen ♀	Abdomen ♂	Ovar	Eier	Hoden	Vas def.	Mitteldarm	Malpighi-Gefäße	Fettkörper	Rectalblase	Flügel
Anzahl Abdomina oder Organe je Bestimmung		10 – 20	10 – 20	20	700 (150)	60	30	60	60	30	30	20
n	+	6	5	4	2 (2)	3	1	1	1	1	1	4
	a	4	4	2	2 (2)	2	1	1	1	1	2	1
	bch	4	3	2	2 (1)	2	1	1	1	1	2	3

Die Abdominalorgane wurden in Ringerlösung freipräpariert, in frischer Ringerlösung nachgespült und in absolutem Alkohol gesammelt. Dabei wurde stets darauf geachtet, anhaftende Fettkörperlappen zu entfernen, was nur bei den Ovarien nicht immer vollständig gelang, da die Eischläuche sehr leicht zerreißen. Die Eier wurden 1—2 Tage nach der Ablage gesammelt. Als „Fettkörper" sind nur die der Körperwand anliegenden („parietalen" [WEBER 1955]) Fettkörperlappen erfaßt. Von den Flügeln, die zur Ergänzung der Untersuchung noch hinzugezogen wurden, fanden nur die an der Basis abgeschnittenen Vorderflügel frisch geschlüpfter Tiere Verwendung.

Die weitere Aufarbeitung erfolgte im verdunkelten Raum bei Rotlicht, um photolabile Substanzen vor Zerfall zu schützen. Zunächst wurden die in Alkohol gesammelten Proben 24 Std über KOH im Exsikkator getrocknet, mit Äther entfettet, die nochmals getrockneten Rückstände sodann zerrieben und in n/2-Ammoniaklösung extrahiert ($^1/_2$ Std). Nach Zentrifugieren wurde die überstehende Lösung auf das Chromatographierpapier (Schleicher und Schüll 2040a für 1-dimensionale, 2043b für 2-dimensionale Chromatogramme) aufgetragen. Die optimale Menge schwankte je nach dem Volumen der Probe zwischen 0,5 und 0,1 ml. Die zahlreichen, gleichfalls in Lösung gehenden Begleitstoffe (Aminosäuren, Peptide, Purine u. a.), die sich durch Ausfällen oder Ausschütteln nicht befriedigend von den fluoreszierenden Stoffen trennen lassen, verschlechtern in höherer Konzentration die Trennung wesentlich. In späteren Versuchen bewährte sich auch direktes Einbringen des präparierten Materials ohne vorherige Entfettung in ein Gemisch aus Methanol und 1%igem Ammoniak (3:1), das nach Zerreiben und Abzentrifugieren der Organe als Extrakt aufgetragen wurde. Bei Flügeln ist eine Entfettung unerläßlich.

Als Laufmittel dienten Propanol-1%iges Ammoniak (2:1) für die 1-dimensionale und Propanol-Ammoniak/Collidin für die 2-dimensionale Chromatographie. Für Vergleichschroma-

togramme fanden außerdem die Systeme Butanol-Essigsäure (nach PARTRIDGE), NH_4Cl (3%), Na-Citrat (4%), Na_2HPO_4 (15%) und α-Picolin-Wasser (60:40) Verwendung.

Die nahezu verlustlose Übertragung kleinster Substanzmengen von einem Blatt auf ein anderes zu Vergleichszwecken wurde durch eine Vorrichtung, ähnlich der von GREGORY (1955) beschriebenen, sehr erleichtert. Die aus einem Chromatogramm ausgeschnittenen Flecke werden hierzu an einer Schmalseite spitz zugeschnitten und mit der Spitze nach oben senkrecht zwischen die Kanten zweier schmaler Glasplatten (z. B. kräftige Objektträger) geklemmt, die durch ein Gummiband zusammengepreßt werden. Das untere Ende des Flecks taucht in ein Schälchen mit dem Lösungsmittel, das im Streifen hochgesaugt wird und in der Spitze die Substanz anreichert (vgl. TURBA 1954). Diese kann nun direkt übertragen werden, indem man sie aus der Spitze in ein horizontal darübergelegtes Blatt überfließen läßt. Ebenso kann ein breiterer Streifen eines 1-dimensinal getrennten Stoffgemisches, mit gleichmäßig eingeschnittenen Zacken versehen, zwischen zwei dünne Glasstäbe eingeklemmt und über eine flache Schale mit Lösungsmittel gelegt werden. Die auf ein zweites Chromatogramm übertragenen Substanzen sind dann als in einer Reihe angeordnete Flecken einer weiteren Trennung zugänglich.

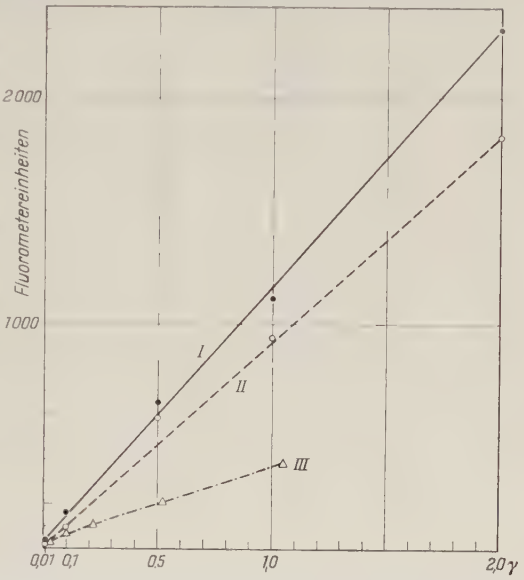


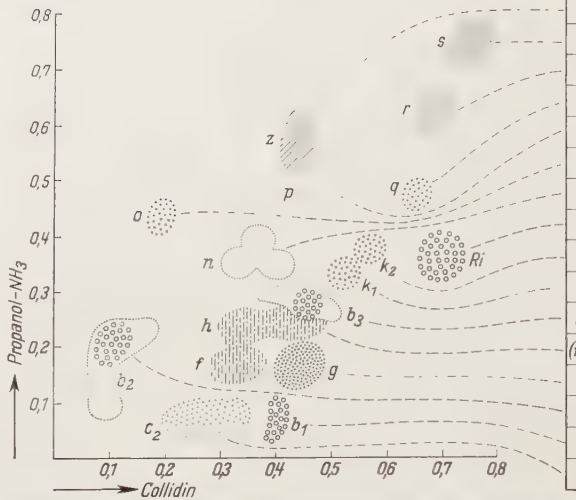
Abb. 1. Fluorometer-Eichkurven von Xanthopterin (I, auf Whatman Nr. 1, II, auf Schleicher und Schüll 2043b) und Isoxanthopterin (III, auf Whatman Nr. 1, nach REISENER, unveröffentlicht), in Propanol/NH_3 gelaufen

Die Fluoreszenzmessung erfolgte unmittelbar vom Papier mit Hilfe eines Fluorometers (KÜHN 1955). Zur Auswertung der 2-dimensionalen Chromatogramme wurden die Flecken planimetriert, ausgeschnitten und gemessen. Der abzuziehende Papierfluoreszenzwert ergibt sich rechnerisch aus dem Flächenverhältnis des „Substanzflecks" und einem gleichfalls planimetrierten und gemessenen Leerfleck aus demselben Chromatogramm. Die Fluoreszenzintensität eines Flecks läßt sich durch Addieren der den aufeinanderfolgenden Spaltbreiten entsprechenden Einzelwerte oder durch Planimetrieren der aus den Meßwerten gewonnenen Kurven bestimmen. Beide Methoden liefern stets einander proportionale Daten; im folgenden sind, wo nicht besonders vermerkt, die Angaben nach dem ersten Verfahren gewonnen.

Eichkurven, die mit steigenden Mengen von Abdominalextrakten aufgenommen wurden, zeigten weitgehend lineare Beziehung zwischen Emission und Stoffkonzentration. Dasselbe gilt für Eichkurven mit reinen Substanzen (2-Amino-6-oxypteridin-8-carbonsäure, GÜNDER 1955; Xanthopterin und Isoxanthopterin, Abb. 1). Bei den Mengen, in denen die fluoreszierenden Substanzen (z. B. Xanthopterin und Isoxanthopterin $< 1\,\gamma$/Abdomen) in den Aufarbeitungen erfaßt werden, macht sich eine Konzentrationslöschung noch nicht geltend. Quantitative Vergleiche derselben Verbindung sind daher zulässig. Die Empfindlichkeit des Meßverfahrens ist gegenüber früheren Angaben (z. B. für Xanthopterin 0,01 γ gegenüber 1 γ [TSCHSECHE 1955]) beträchtlich erhöht.

I. Die qualitative Verteilung der fluoreszierenden Substanzen

a) Die Stoffe. Das aus 91 Chromatogrammen kombinierte Schema eines Fluoreszenzmusters (Abb. 2), das die Verteilung der Stoffe nach 2-dimensionaler Trennung in Propanol-NH_3/Collidin wiedergibt, stimmt mit den früheren Darstellungen (HADORN und EGELHAAF 1956, Abb. 3) im wesentlichen überein. Einige



	Abdomen ♀			Ovar			Eier			Abdomen ♂			Hoden			Vasa def.			Mitteldarm			Malpighi-Gefäße			Rectalblase			Fettkörper			Flügel		
	+	a	bch	+	a	bch	+	a	bch	+	a	bch	+	a	bch	+	a	bch	+	a	bch	+	a	bch	+	a	bch	+	a	bch	+	a	bch
n_G	7	4	4	3	2	2	6	5	5	5	4	3	5	2	2	1	1	1	3	1	1	3	1	1	3	4	3	3	1	1	3	1	1
z		4									2															3(1)							
s	6	(1)	4							5	(1)	3													3		3	(1)			3		1
r	5	(1)	4							5	(1)	3													3		3	(1)			(3)		(1)
q	1		1						(2)																1		2						
p	2	1		3		1							1	1	1										2	3	2						
o	7	3	3	2			5	2	3		1														2	2	2						
n	4	1	3	1					(1)	1		1													3	1	1		(1)				
Ri	2	2	2	2	2	1	3		2	1	(1)	1	2	2			1	1				1				?							
k_2	7	1	3	1		1			1	1	1	1	2		1										?	1?	2				2	1	1
k_1	7	3	4	3	2	2	3	2	5	5	3	3	3		2			1				1			3	4	3	2		1	3	1	1
b_3	1			1	1								2	1	1		1											3		1			
(f)h	7	4	4	3	2	2	5	5	3	5	4	3	5	2	2	1	1					2		1	3	4	3	3			3	1	1
g	7	4	4	3	2	2	6	5	5	5	4	3	5	2	2	1	1	1	3	1	1	3	1	1	3	4	3	3	1	1	3	1	1
b_2	2	1	2	1		2	3		4				1		2				2			2			1								
b_1	2		1	2	2	1					1	1	4	1	1		1		2	1	1	1			1	1		2		1			
c_2	7	4	4	3	2	2	6	5	(1)	5	4	2	3			1	1					1			2	4		2				1	1

Abb. 2. Verteilung der fluoreszierenden Stoffe auf die Abdomina und Organe; die Ziffern geben die Anzahl positiver Befunde wieder. nG = Anzahl der ausgewerteten Chromatogramme. Von den in dem Schema dargestellten Stoffen sind g = Isoxanthopterin, $f + h$ = Xanthopterin, k_1 = 2-Amino-6-oxypteridin, k_2 „HB_2" von *Drosophila*, *Ri* = Riboflavin, z = Tryptophan. — Signaturen für die Fluoreszenzfarben: fein punktiert = hellblau, grob punktiert = ultramarinblau, strichpunktiert = blaugrün, kleine Kreise = gelborange, Schrägstriche = fahlblau. Ziffern in () = Substanz nur in Spuren vorhanden; ? = Vorkommen fraglich

Ergänzungen sind durch das umfangreichere Material und die abgewandelte Technik (Aufarbeitung im Dunkeln, andere Extraktion) notwendig geworden. Um die Substanzen auf ihre Zugehörigkeit zum Tryptophanstoffwechsel zu prüfen, wurden sie papierchromatographisch in verschiedenen Laufmitteln mit folgenden Verbindungen verglichen: Tryptophan, Kynurenin, 3-Oxykynurenin, Kynurensäure, Xanthurensäure, Anthranilsäure, 3-Oxyanthranilsäure, 2-Amino-3-oxyacetophenon, Benzoylalanin[1]. Unter diesen wurde eine Übereinstimmung nur für Tryptophan gefunden. Ferner wurden die Fluoreszenzstoffe auf ihre Identität mit denjenigen gleicher Bezeichnung aus den Köpfen geprüft. Im folgenden sind alle kurz aufgeführt.

c_2: hellblaue Fluoreszenz. Die Verbindung steht dem Xanthopterin nahe (Absorptionsspektrum! Viscontini, Kühn und Egelhaaf 1956)[2].

g: ultramarinblaue Fluoreszenz; Isoxanthopterin.

$f+h$: blaugrüne Fluoreszenz; Xanthopterin. Es wird bei der Chromatographie von *Ephestia*-Extrakten in Propanol/NH_3 oft in zwei Zonen (f und h) getrennt, die aber nicht scharf gesondert sind, sondern häufig ineinander übergehen. Nach Elution und Übertragung auf neue Chromatogramme zeigen sie in allen Laufmitteln dieselben R_f-Werte; ebenso verhalten sie sich papierelektrophoretisch einheitlich. Der Verdoppelungseffekt tritt an synthetischem Xanthopterin (Hoffmann-La Roche) bei gleicher Behandlung nicht auf; er ist sicher nicht mit dem von Tschesche und Korte (1952) beschriebenen (Trennung tautomerer Formen) identisch, sondern auf Inhomogenitäten durch mitwandernde Begleitsubstanzen zurückzuführen.

k_1: blaue Fluoreszenz; 2-Amino-6-oxypteridin.

k_2: blaue Fluoreszenz; das in der Konstitution seiner Seitenkette in C 8 noch nicht völlig gesicherte Pteridin ist mit dem „HB_2" von *Drosophila* identisch.

Da die beiden k-Substanzen, vor allem bei größeren Konzentrationsunterschieden, nicht immer scharf zu trennen sind, werden sie im folgenden mehrfach nur unter dieser Sammelbezeichnung (oder als „k") angeführt.

i als Photolyseprodukt von HB_2 tritt nach Aufarbeitung bei Rotlicht nicht auf (Egelhaaf 1956b).

Die Stoffe n mit grünlicher, o mit ultramarinblauer, p mit grünlicher oder gelblicher und q mit blauer Fluoreszenz sind noch nicht näher untersucht.

r und s: blaugrüne Fluoreszenz. r zeigt in mehreren Laufmitteln (Propanol/NH_3, Collidin, Na-Citrat) Übereinstimmung mit Kynurensäure, unterscheidet sich von dieser jedoch durch den R_f-Wert in Butanol-Essigsäure und durch das Ausbleiben des für die Kynurensäure typischen photochemischen Verhaltens (Wiss und Hellmann 1953): die Fluoreszenz von r nimmt bei Belichtung nicht zu. Die ständige Vergesellschaftung und die Ähnlichkeit der Absorptionsmaxima ($\lambda_{max}^{n.\,10\text{-}NaOH}$ etwa 350, 265—267, < 220 mμ) der Stoffe r und s sprechen für eine nahe chemische Verwandtschaft. Verschiedene Befunde (S. 775) machen ihre Zugehörigkeit zum Tryptophanstoffwechsel wahrscheinlich. Sie zeigen folgende R_f-Werte (Tabelle 2):

[1] Für die Überlassung der Vergleichssubstanzen bin ich Herrn Prof. Dr. A. Butenandt zu großem Dank verpflichtet.

[2] Die in dieser Arbeit identifizierten Pterine sind im folgenden ohne besonderen Hinweis angeführt.

Eine eingehendere Charakterisierung war der geringen anfallenden Stoffmengen wegen bisher noch nicht möglich.

z: fahlblaue Fluoreszenz. Diese ist in frischen Chromatogrammen nur schwach wahrnehmbar, verstärkt sich jedoch durch längere Lagerung auch im Dunkeln (HADORN und EGELHAAF 1956) zu intensiv hellblauer Farbe. Gleichzeitig verfärbt sich *z* gelblich. Durch Besprühen mit H_2O_2 und $NaNO_2$ läßt sich derselbe Effekt auch an frischen Chromatogrammen hervorrufen. *z* reagiert mit bräunlicher Farbe auf Besprühen mit Ninhydrin, wird braunviolett mit Na-β-Naphthochinonsulfonat und violett mit p-Dimethylaminobenzaldehyd. Die Vermutung, daß es sich dabei um Tryptophan handeln könne, wurde bestätigt durch papierchromatographischen Vergleich mit synthetischem Tryptophan (Merck) in mehreren Lösungsmitteln, durch die Übereinstimmung der UV-Spektren (Abb. 3) und die gleichen Reaktionen bei Besprühen der synthetischen Verbindung mit Oxydationsmitteln.

Tabelle 2. *R_f-Werte der Substanzen r und s in verschiedenen Lösungsmitteln*

	r	*s*
Propanol/NH_3	0,62	0,72
Na-Citrat . .	0,46	0,44
Butanol-Eisessig-H_2O (4:1:5) . .	0,45	0,74
Collidin . . .	0,65	0,80

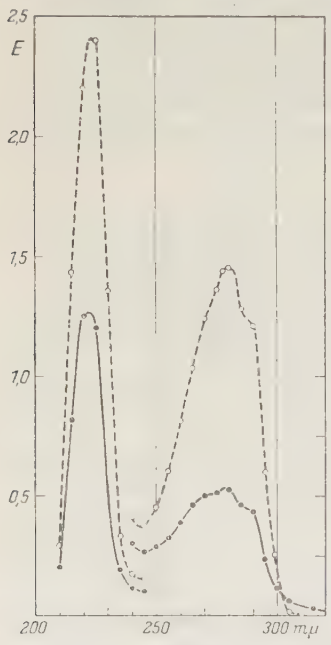


Abb. 3. UV-Absorptionsspektren der Substanz *z* (——) und von synthetischem D,L-Tryptophan (- - -) in n/10-NaOH aufgenommen

„*b*-Substanzen": gelbe bis orangefarbene Fluoreszenz. b_1 entspricht wohl dem der Köpfe (HADORN und KÜHN 1953), b_2 und b_3 sind in Form und Lage sehr variabel. Über ihre chemische Natur ist noch nichts bekannt.

Riboflavin: gelbe Fluoreszenz (REISENER 1956, VISCONTINI, KÜHN und EGELHAAF 1956).

b) Verteilung der Stoffe auf die Organe. Sämtliche untersuchten Organe enthalten Isoxanthopterin und mit Ausnahme des Mitteldarms auch Xanthopterin. Ebenso sind die Pterine c_2 (nicht im Mitteldarm) und *k* (ebenfalls nicht im Mitteldarm) allgemein verbreitet. Unter den gelb fluoreszierenden Stoffen ist b_1 in den Ovarien, nicht aber in den abgelegten Eiern zu finden, darüber hinaus in allen Organen außer den Malpighi-Gefäßen und Flügeln. Weniger verbreitet sind b_2 und b_3 (Ovar, Hoden, Vas deferens, Fettkörper). Riboflavin trat (nicht regelmäßig) in Ovarien, Eiern, Hoden und Samenleitern auf; dagegen nur einmal in den Malpighi-Gefäßen, wo es nach BUSNEL und DRILHON (1942) in Abhängigkeit vom Riboflavingehalt des Mehls stets vorkommen soll.

Die Substanz *n* ist auf Ovarien und Exkretblase, *o* auf Ovarien, Eier und Exkretblase und *p* auf Ovarien, Hoden und Exkretblase beschränkt. *q* wurde außer im Exkret nur in geringer Menge in Eiern festgestellt.

Freies Tryptophan konnte nur im Meconium des Enddarms nachgewiesen werden, während *r* und *s* auch in den Flügeln und in einem Falle (in sehr geringer

Menge) im Fettkörper gefunden wurden. Die Extraktion von Schuppen, die von den Flügeln abgestäubt und gesammelt worden waren, bewies, daß *r* und *s* — wie die übrigen für die Flügel angeführten Stoffe — in den Schuppen selbst abgelagert werden. Als farbige Musterelemente treten die Pterine des Flügels allerdings nicht in Erscheinung; ihre Konzentration ist sehr gering.

Die drei Stoffe *r*, *s* und Tryptophan lassen sich nach ihrem Vorkommen als ausgesprochene Exkretprodukte bezeichnen, wobei das Auftreten der beiden ersteren im Flügel dessen Rolle als „Exkretspeicher" bestätigt, die ihm schon von Hopkins (1895) zugeschrieben wurde. Darüber hinaus gehen — mit Ausnahme von b_3 und Riboflavin — alle im Körper vorkommenden Fluoreszenzstoffe ins Meconium über.

Sie entstammen möglicherweise den Nahrungsresten, binnenkörperhaltigen Vacuolen (Wolfram 1949) und dem bei der Metamorphose zerfallenden Zellmaterial des Darmtrakts; wahrscheinlich sind auch echte Exkrete aus den Malpighi-Gefäßen beteiligt (vgl. Hadorn und Kürsteiner 1956). Da der imaginale Mitteldarm schon entleert ist, ließe sich diese Frage nur durch Untersuchung der betreffenden Organe in späten Larven- und Puppenstadien klären.

Die (mit Ausnahme des Mitteldarms) in allen Körperteilen vorkommenden Pterine (Isoxanthopterin, Xanthopterin, *k* und c_2) sind ohne Zweifel allgemeine Zellbestandteile, deren Anwesenheit keine Beziehung zu spezifischen Organfunktionen erkennen läßt, sondern auf fundamentale Stoffwechselprozesse hinweist. Die Hämolymphe selbst enthält überraschend wenig fluoreszierende Stoffe; nur Isoxanthopterin konnte in sehr geringer Konzentration nachgewiesen werden. Die Stoffe werden also offenbar in der vorliegenden Form nicht oder kaum im Blutstrom transportiert, sondern bleiben in der Zelle fixiert.

c) Verteilung der Stoffe auf die drei Genotypen. Die rotäugige Mutante weist ein von + und *bch* abweichendes Fluoreszenzmuster auf. Es ist um die Stoffe *q*, *r* und *s* ärmer, enthält jedoch — im Gegensatz zu der früheren Darstellung (Hadorn und Egelhaaf 1956) — wie die beiden anderen Genotypen k_2 und darüber hinaus freies Tryptophan (*z*). *r* und *s* waren nur einmal in geringer Menge im *a*-Abdomen nachweisbar. Das Vorhandensein der beiden Stoffe ist offenbar von der Anwesenheit des Gens a^+ abhängig: sie kommen sowohl in der Kombination $a^+/.$; *bch*/*bch* wie auch bei $a^+/.$; *wa*/*wa*-Tieren vor. Durch Injektion von Kynureninsulfat in junge *a*-Puppen konnte in einem von drei Versuchen die Bildung von *s* (und sehr wenig *r*) ausgelöst werden. Die zwei Substanzen gehören also sehr wahrscheinlich dem Tryptophanstoffwechsel an.

Jedenfalls aber ist der genabhängige Unterschied zwischen *bch* und a^+ einerseits und *a* andererseits, der sich im wesentlichen im Vorkommen der Exkretprodukte *q*, *r*, *s* und Tryptophan manifestiert, auf den Schritt $a^+ \rightarrow a$ zurückzuführen. Er beeinflußt somit die qualitative Zusammensetzung des abdominalen Fluoreszenzmusters, während die Mutation $+ \rightarrow bch$, die im Auge das Xanthopterin und die Pterine k_2 und c_1 und c_2 zum Verschwinden bringt, im Abdomen diese Wirkung nicht zeigt; *bch*-Abdomina enthalten beide *k*-Substanzen, c_2 und Xanthopterin.

Die gelbfluoreszierenden Stoffe („*b*-Gruppe", Riboflavin) sind bei allen drei Genotypen vorhanden und lassen keine Beziehungen zu diesen erkennen.

II. Die quantitative Verteilung

Die Streuung der Fluoreszenzwerte der Abdomina ist außerordentlich groß (HADORN und EGELHAAF 1956). Sie ist vor allem auf den unterschiedlichen Entwicklungszustand der Ovarien und den Füllungsgrad der Exkretblase auch bei gleichalten Tieren zurückzuführen. Diese beiden Körperteile liefern den Hauptanteil fluoreszierender Stoffe im Abdomen (Tabelle 5).

Die durchschnittlich schwächere Fluoreszenz der *a*-Abdomina (HADORN und EGELHAAF 1956) konnte auch am vorliegenden Material bestätigt werden, wenn auch der Unterschied gegenüber + und *bch* weniger deutlich wurde als auf Grund der an Einzeltieren gewonnenen Messungen.

Mit der quantitativen Erfassung der Fluoreszenz der einzelnen Organe und der in ihnen enthaltenen Stoffe konnte nun die Menge fluoreszierender Substanzen des Körpers mit denen des Kopfes verglichen und ferner der Anteil der einzelnen Organe an der Gesamtfluoreszenz des Abdomens und die relative Menge einzelner Stoffe in den Organen bestimmt werden. Bei der letzteren Untersuchung wurden nur die Pterine k_1, k_2, Xanthopterin und Isoxanthopterin berücksichtigt.

a) Stoffkonzentration in Organen und Abdomen und deren Anteile an der Gesamtfluoreszenz.

Von je einem ♀ und einem ♂ der drei Genotypen wurden Kopf und Abdomen in frischem Zustand gewogen. Die beiden Teile wurden gesondert in Methanol/NH_3 extrahiert, und alle auf ein Blatt aufgetragenen Extrakte 1-dimensional entwickelt und gemessen. Auf das Gewicht bezogen, ergaben sich folgende Verhältnisse (Tabelle 3):

Tabelle 3. *Verhältnis der Fluoreszenzintensität Kopf/Abdomen* (= 1), *bezogen auf das Frischgewicht*

+ ($K_{24}Sy$)		*a* (hellgelb)		*bch*	
♀	♂	♀	♂	♀	♂
19,6	25,4	32,6	27,3	11,2	43,4

Obgleich diese Daten — da sie nur auf je einer Einzelmessung beruhen — nicht als repräsentativ für Stammesunterschiede gelten dürfen, so zeigen sie doch, daß die Konzentration der fluoreszierenden Substanzen im Kopf (und damit ganz überwiegend in den Augen, REISENER 1956) durchschnittlich 20—30mal so hoch ist als im Abdomen.

In einer weiteren Meßreihe wurden von Abdomen und Organen das Trockengewicht und dann die Fluoreszenzwerte bestimmt (Tabelle 4).

Tabelle 4. *Fluoreszenz/mg Trockengewicht von* $^{+}$*-Tieren.* n = Anzahl Organe bzw. Abdomina/Bestimmung

	Abdomen		Ovar	Hoden	Vas deferens	Mitteldarm	Malpighi-Gefäße	Fettkörper	Rectalblase
	♀	♂							
n	20	20	20	60	30	60	60	30	30
Fluoreszenz/mg	250	235	478	540	65	296	927	86	275

Relativ am stärksten fluoreszieren also Malpighi-Gefäße, Hoden und Ovarien, besonders schwach die Vasa deferentia und Fettkörper. Zum Vergleich ist die Kopffluoreszenz mit etwa 6000/mg anzusetzen.

Extrakte aus Abdomen und Organen wurden 1-dimensional chromatographiert und die gemessenen Fluoreszenzintensitäten auf je ein Tier umgerechnet. Die Fluoreszenz der Ovarien ist auf die Abdominalfluoreszenz der ♀♀ (= 100) bezogen, die der Hoden und Samenleiter auf die Fluoreszenz der männlichen Abdomina. Bei den übrigen Organen wurde, da sie

gleichermaßen den ♀♀ und ♂♂ entnommen worden waren, als Bezugsgröße der Durchschnitt aus weiblichen + männlichen Abdomen gewählt (Tabelle 5).

Ob bei dem vorliegenden Material signifikante Unterschiede zwischen den Genotypen zutage treten, und ob bei den ♂♂ von + und *a* die Exkretblasen und Fettkörper reicher entwickelt oder stärker fluoreszierend sind — wie es die Addition der Anteile nahelegt —, kann hier nicht entschieden werden. Jedenfalls aber liefern Ovarien und Exkretblase den Hauptanteil an der Abdominalfluoreszenz. Die Hoden tragen bei *Ephestia* — im Gegensatz zu den Befunden an *Drosophila* (Hadorn und Mitchell 1951) — nur wenig zur Gesamtfluoreszenz bei, wesentlich mehr die voluminösen Vasa deferentia trotz ihrer geringen Konzentration fluoreszierender Stoffe (Tabelle 4).

Tabelle 5. *Anteil der Fluoreszenz einzelner Organe in Prozent der Gesamtfluoreszenz der Abdomina*

		Ovar	Hoden	Vas deferens	Mitteldarm	Malpighi-Gefäße	Fettkörper	Rectalblase
+	*Sb*	85,3	7,3	20,7	1,7	2,9	14,7	37,7
	Bk 19	60,6	3,6	—	1,1	1,9	10,9	42,1
a	*dkl. rot*	80,2	8,5	28,0	1,7	1,1	9,8	37,2
	kl. rot	88,4	6,9	—	—	—	—	14,3
	bch	58,6	4,8	6,8	0,6	4,5	29,4	20,3
		54,6	3,5			—	—	23,5

b) Xanthopterin/Isoxanthopterin-Verhältnis. Der quantitative Vergleich der drei Genotypen berücksichtigt nur die Pterine k_1, k_2, Xanthopterin und Isoxanthopterin, da diese regelmäßig vorkommen, sauber getrennt werden und dadurch sicher zu erfassen sind. Die Meßwerte zeigen eine außerordentlich starke Streuung; für Isoxanthopterin wurden folgende Werte ermittelt (Tabelle 6).

Tabelle 6. *Isoxanthopterinmenge* (in Fluorometereinheiten; 1 γ entspricht etwa 380 Skalenteilen) *in Abdomen und Organen, bezogen auf 1 Tier* (bzw. 100 Eier oder frisch geschlüpfte Räupchen)

	Abdomen ♀	Abdomen ♂	Ovar	Eier	Räupchen	Hoden	Vas deferens	Mitteldarm	Malpighi-Gefäße	Fettkörper	Rectalblase	Flügel
	110,5	11,9	38,6	16,8	88,0	0,7	6,3	0,3	0,9	3,7	6,4	0,7
	122,6	12,8	63,7	22,5		0,7						0,9
	139,5	17,0	100,9	48,7		3,0						1,3
+	154,5	26,1	115,0	75,0								1,5
	165,6	44,6										
	191,4											—
	69,1	18,4	63,5	17,7	58,0	0,8	2,0	0,3	0,3	1,9	4,2	1,5
	72,2	24,2	64,2	46,5		3,0					7,9	
a	123,0	33,5		59,5								
	169,2	33,5		69,3								
	148,0	29,7	179,7	99,0	203,8	1,6	3,7	0,2	3,2	9,5	9,5	2,1
	180,0	30,0	343,3	113,0		3,9					14,5	3,6
bch	234,0	37,4		273,0								6,7
	295,7											

Die varianzanalytische Auswertung[1] — auf Grund der zu geringen Anzahl von Einzeldaten waren durch einen verteilungsfreien Test keine befriedigenden

[1] Für die statistische Beurteilung des der Tabelle 7 zugrunde liegenden Materials schulde ich Herrn Dr. R. Wette, Heidelberg, verbindlichen Dank.

Ergebnisse zu gewinnen — ergab einen gesicherten Unterschied zwischen + und *a* einerseits und *bch* andererseits ($p < 0{,}01$; Tabelle 7). Ein Unterschied $+/a$ war an diesen über alle Organe gemittelten Werten nicht zu sichern ($P \leq 0{,}05$).

Tabelle 7. *Streuungszerlegung der Isoxanthopterinwerte unter Zugrundelegung einer logarithmischen Normalverteilung.* Die Werte von Räupchen und Flügeln sind nicht mit einbezogen (n = 10)

Variabilitätsursache	QS	f	MQS	F	P
1. Zwischen den Organen .	43,51087	9	4,83454	105,38	$\ll 0{,}001$
2. Zwischen den Mutanten					
$+/a/bch$	0,70086	2	0,35043	7,64	$< 0{,}01$
(Zwischen $+/a$	0,19647	1	0,19647	4,28	$\leq 0{,}05$)
(Zwischen $+ + a/bch$ . .	0,50439	1	0,50439	10,99	$< 0{,}01$)
3. Wechselwirkung					
Organe. Mutanten . .	1,59850	18	0,08881	1,94	$\leq 0{,}05$
Zufallstreuung	1,697493	37	0,045878		
Gesamt	47,51772	66	—	—	—

Im Abdomen von *bch* ist also der Isoxanthopteringehalt wie im Auge höher als bei den beiden anderen Genotypen. Bezieht man nun die Fluoreszenzwerte des Xanthopterins (in %) auf die des Isoxanthopterins, so ergeben sich folgende Relationen (Tabelle 8).

Tabelle 8. *Verhältnis der Fluoreszenzintensität von Xanthopterin/Isoxanthopterin* (= 100%). Bei den mit 0 bezeichneten Messungen war Xanthopterin in nicht meßbarer Menge oder überhaupt nicht vorhanden. Die Werte geben nicht die Gewichtsverhältnisse wieder, da Isoxanthopterin viel schwächer registriert wird (vgl. Abb. 1)

	Abdomen ♀	Abdomen ♂	Ovar	Eier	Räupchen	Hoden	Vas deferens	Mitteldarm	Malpighi-Gefäße	Fettkörper	Rectalblase	Flügel
+	112,4	74,7	160,5	116,0	177,5	254,6	195,2	0	33,3	214,0	230,7	147,3
	192,9	185,3	251,8	128,5		597,0						170,0
	196,5	298,7	267,0	143,0		827,0						250,0
	199,0	339,0	286,8	153,0								297,0
	207,6	386,0										
	249,1											
a	216,5	197,8	264,5	166,8	271,0	200,0	350,0	0	0	0	180,2	223,0
	262,1	244,9	267,0	304,6		294,0					374,2	
	290,7	256,1		324,8								
	551,5	278,3		417,1								
bch	34,2	73,2	27,1	10,4	17,0	15,4	0	0	33,8	0	0	0
	49,3	100,7	33,3	31,4		25,0					107,7	24,8
	73,5	135,0		36,2								87,8
	111,3											

Die Mutante *bch* unterscheidet sich im Verhältnis Xanthopterin/Isoxanthopterin wesentlich von der Wildform; die Quotienten sind fast überall sehr niedrig. Das gilt für Ovarien und Hoden und als Extremfall für die Augen und Samenleiter, in denen überhaupt kein Xanthopterin mehr auftritt (Quotient 0). Ebenso ist in den Flügeln der Xanthopteringehalt relativ gering; die Epidermis, aus der Flügel und Schuppen hervorgehen, ist also von derselben Stoffwechseländerung betroffen. Wie die Ovarien zeigen überdies die abgelegten Eier und die

frischgeschlüpften Räupchen niedere Xanthopterin/Isoxanthopterin-Werte (Egelhaaf 1956a), und es kann angenommen werden, daß auch die späteren Stadien ähnliche Verhältnisse aufweisen.

Eine Untersuchung hierüber, die noch nicht abgeschlossen ist, wird erweisen, ob die Mutation, soweit sie dieses Phän betrifft, gleichmäßig in allen Stadien oder ob sie phasenspezifisch wirkt.

Nicht übereinstimmend verhalten sich Malpighi-Gefäße, Fettkörper (wo auch bei *a* kein Xanthopterin vorkommt) und Mitteldarm. Letzterer reagiert offenbar — in Umkehrung der Verhältnisse — bei den *bch*$^+$-Stämmen abweichend, indem er kein Xanthopterin bildet. Im Exkret (und vielleicht dominiert auch in den Malpighischen Gefäßen die Exkretfluoreszenz?) scheint die Xanthopterin/Isoxanthopterinrelation stärker zu variieren. In einem Falle ist sie bei *bch* ziemlich hoch; und vielleicht rührt von dem beträchtlichen Anteil des Exkrets an der Gesamtfluoreszenz der männlichen Abdomen auch deren relativ hoher Xanthopterinwert bei *bch* her.

Die in den zell- und plasmareichen Materialproben (Augen, Ovarien, Eier, Hoden, Samenleiter, Derivate der Flügelepidermis) gefundenen Werte zeigen jedenfalls, daß dort überall die Mutation *bch*$^+ \rightarrow$ *bch* gleichsinnig auf den Stoffwechsel der beiden isomeren Pterine einwirkt.

Die Pterine k_1 und k_2 lassen in ihrer quantitativen Verteilung keine regelmäßige Beziehung zu den untersuchten Genotypen erkennen. Lediglich in den Eiern übertrifft *bch* in der Menge der *k*-Substanzen die Wildform. In Extrakten aus je 100 Eiern liegt *k* aus + schon unter der visuellen und fluorometrischen Erfassungsgrenze, während *bch* noch deutlich meßbare Mengen liefert. Vermehrtes Auftreten von *k* und Isoxanthopterin, wie es im Auge von *bch* vorliegt, scheint in den übrigen Organen nicht streng korreliert zu sein. Das Auge nimmt also auch hierin eine Sonderstellung ein.

c) Exkretprodukte r, s und Tryptophan. Die Stoffe *r* und *s*, die nur bei *a*$^+$-Tieren auftreten, sind entsprechend dem verschiedenen Füllungsgrad der Rectalblase in sehr variabler Menge vorhanden. Auch das Verhältnis zwischen beiden ist verschieden; manchmal überwiegt *r*, manchmal *s*. Mit zunehmendem Alter nach dem Schlüpfen steigt der *r*- und *s*-Gehalt der Exkretblase stark an. Sie wird vor dem Tod häufig nicht mehr entleert (Wolfram 1949) und schwillt vor allem beim ♂ merklich an. Daraus erklärt sich auch die erhöhte Zunahme der beiden Exkretprodukte.

Tryptophan wurde in nachweisbaren Mengen nur im Abdomen von *a*-Tieren gefunden.

Eine angenäherte Bestimmung wurde folgendermaßen gewonnen: Extraktion von je 3×5 Exkretblasen von *a*$^+$- und *a*-Tieren in 75%igem Methanol; Auftragen der Extrakte zusammen mit vier verschiedenen Konzentrationen synthetischen D,L-Tryptophans (Merck) auf ein Blatt und 1-dimensionale Entwicklung in 70%igem Propanol. Die mit p-Dimethylaminobenzaldehyd entwickelten Flecken wurden mit dem Extinktionsschreiber von Zeiß direkt auf dem Papier vermessen.

Im Vergleich mit der nahezu linear verlaufenden Eichkurve der Kontrollsubstanz (2—20 γ) ließ sich die Tryptophanmenge durch Extrapolation auf 1—3 γ/Exkretblase bestimmen. Sie ist bei ganzen *a*-Abdomen etwa von derselben Größe, wodurch bestätigt wird, daß außerhalb der Exkretblase keine

nennenswerte Akkumulation erfolgt. Die a^+-Exkretblasen der gleichen Versuchsreihe ergaben keine Reaktion.

Damit wird der Befund von CHEN und KÜHN (1956) bestätigt, wonach in Körperextrakten von *a*-Tieren freies Tryptophan auftritt. Daß es in der Hämolymphe nicht nachzuweisen war, wird aus dem ausschließlichen oder überwiegenden Vorkommen in der Exkretblase erklärlich. Nach CHEN und KÜHN erreicht der Tryptophangehalt sein Maximum in der älteren Puppe, um nach dem Schlüpfen wieder abzufallen. Dieser Rückgang ist möglicherweise auf die Abgabe von Meconien zurückzuführen. Ob es sich beim Exkrettryptophan um ein Abbauprodukt der bei *a* besonders tryptophanreichen Eiweiße (CASPARI 1946, BUTENANDT und ALBRECHT 1952) oder um den primär nicht weiteroxydierten und daher angehäuften Stoff handelt, ist nicht ohne weiteres zu entscheiden. Da es aber schon in der frühen Raupe auftritt (CHEN und KÜHN 1956), ist die zweite Annahme die wahrscheinlichere.

Besprechung der Ergebnisse

Die Augenfarbmutanten von *Ephestia* haben wichtige Einblicke ermöglicht in Abläufe des Tryptophan-(bzw. Ommochrom)- und Eiweißstoffwechsels (ausführliche Zusammenfassung: KARLSON 1954). Durch Einbeziehung der fluoreszierenden Stoffe wurden nun auch verschiedene Pterine der genetischen Analyse zugänglich. Eine solche verspricht in Verbindung mit Transplantations- und Injektionsversuchen Informationen über Biosynthese und Stoffwechselzusammenhänge dieser Verbindungen. *Bombyx* und vor allem *Drosophila* (HADORN und MITCHELL 1951, HADORN 1951, DANNEEL und ZIMMERMANN 1954, HADORN 1954, DANNEEL 1955, HADORN und SCHWINCK 1956) haben hierfür schon aufschlußreiches Material geliefert. Bei den *Drosophila*mutanten *w* und *bw* z. B. wird Isoxanthopterin nach dem Schlüpfen der Imagines rasch abgebaut (HADORN 1954). Bei ry^2 fehlt es überhaupt, kann jedoch durch implantiertes +-Gewebe gebildet oder angereichert werden (HADORN und SCHWINCK 1956).

Demgegenüber ist *bch* von *Ephestia* eine Mutante mit erhöhtem Isoxanthopteringehalt, bei der das Xanthopterin reduziert ist. Über die biochemischen Grundlagen lassen sich noch kaum Vermutungen anstellen. Ob aus einer gemeinsamen Vorstufe bei bch^+ bevorzugt Xanthopterin, bei *bch* die isomere Form gebildet wird, oder ob ein zwischen beiden Verbindungen bestehendes Gleichgewicht in der einen oder anderen Richtung verschoben wird, bleibt neben anderen Möglichkeiten einstweilen völlig offen.

Sicher aber darf diese in den meisten Organen deutlich werdende Manifestation des Faktors *bch* als eine *innerzellige Wirkung* angesehen werden. Parabioseversuche mit +-Tieren sollen entscheiden, ob eine +-gemäße Beeinflussung stattfindet oder ob wir es — im Gegensatz zur Rotäugigkeit der *a*-Mutante — mit einem „Autophän" (HADORN 1955) zu tun haben. Die Polyphänie von *bch*, wie sie sich in dem besonderen Reaktionssystem „Auge" ausprägt (Ausfall des gelben Corneazellpigments, Umfärbung des Hauptpigments, KÜHN und BERG 1955a), umfaßt sicher der obengenannten, „primären" Genwirkung nachgeordnete Reaktionen.

Gegenüber *Drosophila* (HADORN und MITCHELL 1951) sind bemerkenswerte Unterschiede in der Verteilung der Fluoreszenzstoffe festzustellen: Dort sind

Hoden und Malpighi-Gefäße die Hauptquelle abdominaler Fluoreszenz, vor allem ausgezeichnet durch hohen Gehalt an Isoxanthopterin, das den Ovarien und Eiern ganz fehlt. Bei *Ephestia* ist der Anteil von Hoden und Malpighi-Gefäßen an der Gesamtfluoreszenz trotz der hohen relativen Intensität dieser Organe gering: die Ovarien enthalten die Hauptmenge fluoreszierender Stoffe, darunter — im Gegensatz zu *Drosophila* — auch reichlich Isoxanthopterin. Übereinstimmend sind bei beiden Arten Hämolymphe und Fettkörper arm an fluoreszierenden Stoffen.

Aus Organfunktion und Verteilung der fluoreszierenden Stoffe lassen sich – auch unter Beschränkung auf die schon identifizierten Substanzen, die quantitativ den Hauptanteil ausmachen —, auf deren physiologische Rolle keine deutlichen Hinweise gewinnen.

Daß dem Xanthopterin und Isoxanthopterin Stoffwechselbedeutung zukommen kann, zeigen verschiedene Befunde (Zusammenfassung Albert 1954, Ziegler-Günder 1956). Neben komplexeren Wirkungen (z. B. einer antianämischen [Tschesche und Wolf 1937] des Xanthopterins oder einer Vitamin B_1- und B_2-Wirkung des „Fluorescyanins" [Busnel 1945]) wurde unter anderem eine erhöhte Atmung fluorescyaninhaltiger Fischhaut gefunden (Polonovski, Busnel und Pesson 1946); die Beteiligung des Isoxanthopterins als einer Komponente des Fluorescyanins bleibt allerdings dabei noch fraglich. Ebenso bleibt noch offen, ob der Isoxanthopterinmangel der *Drosophila*mutante ry^2 als direkte Ursache für deren gesenkte Vitalität gelten kann (Hadorn und Schwinck 1956). Zwischen bch^+ und *bch* von *Ephestia* wurde kein Vitalitätsunterschied gefunden, höchstens in Kombination mit anderen Faktoren (Kühn und Berg 1955a). Die Verschiebung des Xanthopterin/Isoxanthopterin-Verhältnisses ist also nicht Anzeichen eines Eingriffes in lebenswichtige Prozesse, sofern sie nicht eine regulierende Kompensation bedeutet.

Die unter sich so verschiedenartigen Stoffwechselleistungen der stark (Malpighi-Gefäße, Hoden, Ovarien) oder der schwach fluoreszierenden (Fettkörper, Samenleiter) Organe können diese quantitativen Unterschiede der Fluoreszenzstoffe nicht erklären. Auch die außerordentlich starke Anreicherung im Auge läßt sich aus seiner Funktion allein kaum ableiten, selbst wenn man einigen photolabilen Stoffen (k, c_1?) eine Beteiligung am Sehprozeß einräumt. Gerade bei den k-Substanzen sind die Indizien für eine physiologische Aktivität am zwingendsten. Das lichtempfindliche 2-Amino-6-oxypteridin (k_1) ist selbst wieder als Photolyseprodukt der Folsäure (Lowry, Bessey und Crawford 1949) und des Pterins HB_2 = k_2 bekannt geworden (Viscontini, Loeser und Egelhaaf 1956). Diese letztere Verbindung ist sehr stark photolabil; eine ähnliche oder gar identische wurde aus Amphibien isoliert (Ziegler und Ziegler-Günder 1955). Ob die k-Stoffe, die ja wie die anderen Pterine im Auge viel höher konzentriert als im Körper vorliegen, an Sehvorgängen beteiligt sind, müssen vergleichende Untersuchungen der verschiedenen Augenmutanten, vor allem auch der fluoreszenzarmen, weißäugigen Rasse (Kühn und Berg 1955b), auf ihre Sehleistung und spektrale Empfindlichkeit zeigen.

Daß aus den Flügeln und Augen, auch wenn sie lange dem Tageslicht ausgesetzt waren, die photolabilen k-Stoffe isoliert werden können, und nicht etwa anstelle von k_2 das Photolyseprodukt Pterin-8-carbonsäure gefunden wird, weist

darauf hin, daß diese Stoffe entweder in stabiler Form vorliegen oder durch lichtabsorbierendes Pigment geschützt werden. Überhaupt bleibt noch zu klären, ob die fluoreszierenden Substanzen im nativen Zustand dem chromatographisch isolierten entsprechen. Viele Pterine, soweit sie nicht wie z. B. das Xanthopterin im Integument kristallin abgelagert werden (BECKER 1937), scheinen in Bindung an Proteine vorzuliegen (ZIEGLER-GÜNDER 1956), aus der sie mehr oder weniger leicht freizusetzen sind. Über diese Frage müssen fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen Aufschluß geben.

Zusammenfassung

Durch papierchromatographische Trennung von Extrakten verschiedener Abdominalorgane, ganzer Abdomen, abgelegter Eier und der Flügel wurde deren Bestand an fluoreszierenden Substanzen bei den drei Genotypen +, *a* und *bch* aufgenommen.

In allen untersuchten Organen ist Isoxanthopterin vorhanden. Die Pterine c_2, Xanthopterin und 2-Amino-6-oxypteridin wurden gleichfalls in allen Proben, mit Ausnahme des Mitteldarms, nachgewiesen und dadurch als integrierende Zellbestandteile wahrscheinlich gemacht. Eine Anzahl noch nicht identifizierter Stoffe zeigt weniger regelmäßiges Vorkommen.

Die Exkretprodukte *r*, *s* und *q* (?) kommen nur bei a^+-Tieren vor und gehören wahrscheinlich dem Tryptophanstoffwechsel an. *r* und *s* werden auch im Flügel abgelagert. Tryptophan ist auf das Exkret von *a*-Tieren beschränkt.

Die höchste Konzentration fluoreszierender Stoffe findet sich im Auge; es folgen Malpighi-Gefäße, Hoden, Ovarien. Die Mutante *bch* zeichnet sich gegenüber + durch höheren Isoxanthopteringehalt und ein wesentlich niedrigeres Verhältnis von Xanthopterin/Isoxanthopterin aus, das sich in fast allen Organen nachweisen läßt und damit eine intracelluläre Manifestation der Mutation $bch^+ \rightarrow bch$ darstellt.

Literatur

ALBERT, A.: The Pteridines. Fortschr. Chem. organ. Naturstoffe **11**, 350 (1954). — BECKER, E.: Über das Pterinpigment bei Insekten und die Färbung und Zeichnung von *Vespa* im besonderen. Z. Morph. u. Ökol. Tiere **32**, 672 (1937). — BUSNEL, R. G.: Actions physiologiques de la fluorescyanine, ptérine des vertébrés inférieurs. Bull. Soc. zool. France **70**, 30 (1945). — BUSNEL, R. G., et A. DRILHON: Recherches sur la répartition de la riboflavine (vitamin B_2) et de quelques autres substances fluorescentes chez les Insectes. Arch. Zool. exper. gén. **82**, 321 (1942). — BUTENANDT, A.: Biochemie der Gene und Genwirkungen. Naturwiss. **40**, 91 (1953). — BUTENANDT, A., u. W. ALBRECHT: Bestimmungen des Tryptophangehaltes verschiedener Rassen der Mehlmotte *Ephestia kühniella* als Beitrag zur Analyse der Genwirkungen. Z. Naturforsch. **7b**, 287 (1952). — BUZZATI-TRAVERSO, A.: Paper chromatographic patterns of genetically different tissues: a contribution to the biochemical study of individuality. Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. **39**, 376 (1953). — CASPARI, E.: On the effect of the gene *a* on the chemical composition of *Ephestia kühniella* ZELLER. Genetics **31**, 454 (1946). — CHEN, P. S., u. A. KÜHN: Vergleichende Untersuchung der freien Aminosäuren und Peptide während der Raupen- und Puppenentwicklung verschiedener Genotypen von *Ephestia kühniella*. Z. Naturforsch. **11b**, 305 (1956). — DANNEEL, R.: Über die beiden gelbäugigen Mutanten sev und seen der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster*. Naturwiss. **42**, 566 (1955). — DANNEEL, R., u. B. ZIMMERMANN: Über das Vorkommen und Schicksal des Kynurenins bei verschiedenen *Drosophila*-Rassen. Z. Naturforsch. **9b**, 788 (1954). — EGELHAAF, A.: (a) Quantitativer Vergleich der Fluoreszenzmuster der Eier dreier Genotypen von *Ephestia kühniella*. Naturwiss. **43**, 165 (1956). — (b) Photolabile Fluoreszenzstoffe bei *Ephestia kühniella*. Naturwiss. **43**, 309 (1956). — FORREST, H. S., and H. K. MITCHELL: Pteridines from *Drosophila*. I. Isolation of a yellow pigment. II. Structure of the yellow pigment. J. Amer. Chem. Soc.

76, 5656/5658 (1954). — Goldschmidt, E.: Fluorescent substances in chromatograms of a mutant stock of *Drosophila*. Nature (Lond.) **174**, 883 (1954). — Gregory, G.: A method for rapidly transferring a substance on paper to the origin of a chromatogram. Science (Lancaster, Pa.) **121**, 169 (1955). — Günder, I.: Quantitative Untersuchung über die Entwicklung der Pterine und des Riboflavins in der Haut und im Auge von *Bufo bufo*. Z. Naturforsch. **10b**, 173 (1955). — Hadorn, E.: Chromatographische Trennung und Messung fluoreszierender Stoffe bei Augenfarbmutanten von *Drosophila melanogaster*. Arch. Klaus-Stiftg **26**, 470 (1951). — Ontogenetische Änderung im Gehalt an Isoxanthopterin bei verschiedenen Genotypen von *Drosophila melanogaster*. Experientia (Basel) **10**, 483 (1954). — Letalfaktoren. Stuttgart 1955. — Hadorn, E., u. A. Egelhaaf: Biochemische Polyphänie und Stoffverteilung im Körper verschiedener Augenfarb-Genotypen von *Ephestia kühniella*. Z. Naturforsch. **11b**, 21 (1956). — Hadorn, E., u. A. Kühn: Chromatographische und fluorometrische Untersuchungen zur biochemischen Polyphänie von Augenfarb-Genen bei *Ephestia kühniella*. Z. Naturforsch. **8b**, 582 (1953). — Hadorn, E., u. R. Kürsteiner: Unterschiede in Exkretstoffen bei verschiedenen Genotypen von *Drosophila melanogaster*. Arch. Klaus-Stiftg **30**, 494 (1956). — Hadorn, E., and H. K. Mitchell: Properties of mutants of *Drosophila melanogaster* and changes during development as revealed by paper chromatography. Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. **37**, 650 (1951). — Hadorn, E., and I. Schwinck: A mutant of *Drosophila* without isoxanthopterin which is non-autonomous for the red eye pigments. Nature (Lond.) **177**, 940 (1956). — Hopkins, F. G.: The pigments of the *Pieridae:* a contribution to the study of excretory substances with functions of ornaments. Philosophic. Trans. Roy. Soc. Lond., Ser. B **186**, 661 (1895). — Karlson, P.: Biochemische Wirkungen der Gene. Erg. Enzymforsch. **13**, 85 (1954). — Kühn, A.: Ein Fluorometer für Papierchromatogramme. Naturwiss. **42**, 529 (1955). — Versuche zur Entwicklung eines Modells der Genwirkungen. Naturwiss. **43**, 25 (1956). — Kühn, A., u. B. Berg: (a) Zur genetischen Analyse der Mutation *bch* von *Ephestia kühniella*. Z. Vererbungslehre **87**, 25 (1955). — (b) Über die Kombination von *wa* (weißäugig) und *biochemica* von *Ephestia kühniella*. Z. Vererbungslehre **87**, 335 (1955). Kühn, A., u. A. Egelhaaf: Zur chemischen Polyphänie bei *Ephestia kühniella*. Naturwiss. **42**, 634 (1955). — Lowry, O. H., O. A. Bessey and E. J. Crawford: Photolytic and enzymatic transformations of pteroylglutamic acid. J. of Biol. Chem. **180**, 389 (1949). — Polonovski, M., R. G. Busnel et M. Pesson: Propriétés biochimiques des ptérines. Helvet. chim. Acta **29**, 1328 (1946). — Reisener, E.: Über die Entwicklung des Bestandes an fluoreszierenden Stoffen in den Köpfen von *Ephestia kühniella* in Abhängigkeit von verschiedenen Augenfarbgenen. Z. Vererbungslehre **1956**. — Tschesche, R.: Pteridine. In Hoppe-Seyler-Thierfelder: Handbuch der physiologisch- und pathologisch-chemischen Analyse, Bd. 3. 1955. Tschesche, R., u. F. Korte: Über Pteridine. VI. Zur Kenntnis der Pterorhodinbildung. Ber. dtsch. Chem. Ges. **85**, 139 (1952). — Tschesche, R., u. H. J. Wolf: Die Wirkung der Pterine und einiger anderer Stoffe auf das Blutbild diätanämischer Jungtiere und ausgewachsener Ratten. Hoppe-Seylers Z. **248**, 34 (1937). — Turba, F.: Chromatographische Methoden in der Protein-Chemie. Berlin-Göttingen-Heidelberg 1954. — Viscontini, M., E. Loeser u. A. Egelhaaf: Oxydation des Pterins HB_2 aus *Drosophila* und *Ephestia* durch UV-Bestrahlung. Naturwiss. **43** (1956). — Viscontini, M., E. Loeser, P. Karrer u. E. Hadorn: Fluoreszierende Stoffe aus *Drosophila melanogaster*. 2. und 3. Mitteilung. Helvet. chim. Acta **38**, 1222, 2034 (1955). — Viscontini, M., A. Kühn u. A. Egelhaaf: Isolierung fluoreszierender Stoffe aus *Ephestia kühniella*. Z. Naturforsch. **11b**, 501 (1956). — Viscontini, M., H. Schmid u. E. Hadorn: Isolierung fluoreszierender Stoffe aus *Astacus fluviatilis*. Experientia (Basel) **11**, 390 (1955). — Viscontini, M., M. Schoeller, E. Loeser, P. Karrer u. E. Hadorn: Isolierung fluoreszierender Stoffe aus *Drosophila melanogaster*. Helvet. chim. Acta **38**, 397 (1955). — Weber, H.: Grundriß der Insektenkunde. Stuttgart 1954. — Wiss, O., u. H. Hellmann: Über die Einführung phenolischer Hydroxylgruppen beim oxydativen Tryptophanstoffwechsel. Z. Naturforsch. **8b**, 70 (1953). — Wolfram, R.: Über die Histogenese der Exkretpigmente bei verschiedenen Rassen von *Ptychopoda seriata* Schrk. und *Ephestia kühniella* Z. Z. Vererbungslehre **83**, 254 (1949). — Ziegler-Günder, I.: Pterine: Pigmente und Wirkstoffe im Tierreich. Biol. Rev. Cambridge Philos. Soc. **31**, 313 (1956). — Ziegler, H., u. I. Ziegler-Günder: Über die Photolabilität der Amphibienpterine und die Wirkung dieser Stoffe auf die Sauerstoffaufnahme atmender Gewebe. Z. Naturforsch. **10b**, 642 (1955).

Dr. Albrecht Egelhaaf, Max-Planck-Institut für Biologie, Abt. Kühn, Tübingen.

Zeitschrift für indukt. Abstammungs- und Vererbungslehre, Bd. 87, S. 784—797 (1956)

Aus dem Botanischen Institut der Universität Freiburg i. Br.

ENTWICKLUNGSGESCHICHTLICHE UNTERSUCHUNGEN AN EINIGEN BLÜTENFORMMUTANTEN DER SIPPE 50 VON *ANTIRRHINUM MAJUS* L.*

Von

Rainer Bergfeld

Mit 13 Textabbildungen

(Eingegangen am 1. September 1956)

A. Einleitung

In einem größeren Mutationsversuch, der am Botanischen Institut in Freiburg durchgeführt wurde, traten eine Anzahl Mutanten auf, die größtenteils schon bekannt waren. Aus diesen wurden einige Blütenformmutanten ausgewählt und zu entwicklungsgeschichtlichen Untersuchungen herangezogen. Zu einem solchen Vorhaben sind Organe begrenzten Wachstums besonders gut geeignet, da sich bei ihnen die normale Entwicklung sehr gut verfolgen läßt und dann die mitunter unbedeutenden Abweichungen in den meisten Fällen sofort erkannt werden können. Dadurch ist es möglich, das Eingreifen eines bestimmten Gens in den Entwicklungsablauf genau festzulegen. Unter Umständen kann man so auch Aussagen über die Wirkungsweise der Gene machen, die für eine bestimmte Ausbildungsform verantwortlich sind. Das genetische Verhalten konnte bei diesen Untersuchungen weitgehend außerhalb der Betrachtung bleiben, da es lediglich darauf ankam, den durch ein definiertes Gen bedingten Vorgang nachzuweisen.

B. Material und Methode

Als Untersuchungsmaterial wurde außer der Mutante *viridiflora* und einer gleichzeitig mit ihr spontan in Sippe 50 aufgetretenen, bisher noch nicht beschriebenen Mutante, Pflanzen verwendet, die in der F_2 eines Mutationsversuches mit Chemikalien auftraten. Die Untersuchungen wurden sowohl an frischem als auch an fixiertem Material vorgenommen. Als Fixierungsmittel diente 70%iger Alkohol, dem einige Tropfen Eisessig und Formol zugesetzt wurden. Mikrotomschnitte wurden mit Hämatoxylin nach Delafield oder mit Safranin gefärbt. Es handelte sich dabei um Serienschnitte in Längs- und Querrichtung durch die einzelnen Organe. Für die Präparation der Blüten wurde eine Methode angewendet, die vorher nur für tierische Objekte benutzt wurde und von Elias (1929) für Pflanzen ausgearbeitet wurde. Diese Methode wird im Freiburger Institut schon seit längerer Zeit mit Erfolg angewendet. Die Objekte werden wie oben beschrieben fixiert, anschließend in 70%igen Alkohol aufpräpariert und in einer aufsteigenden Alkohol-Xylolreihe entwässert und gehärtet. Die getrockneten, nun ganz weißen Blüten werden auf geschwärzte Objektträger aufgeklebt und mit Glasstegen und einem großen Deckglas eingerahmt. So präpariert halten sich die Blüten fast unbegrenzt. Die photographischen Aufnahmen wurden mit einer Leica IIIf an

* Teil einer Dissertation der nat.-math. Fakultät der Universität Freiburg i. Br.

Herrn Professor Dr. F. Oehlkers danke ich herzlichst für die Überlassung des Themas und für das Interesse, das er dem Fortgang der Arbeit entgegenbrachte, Herrn Dr. M. Bopp für viele Anregungen und die Unterstützungen während der Arbeit. Die deutsche Forschungsgemeinschaft stellte Herrn Professor Dr. Oehlkers die Mittel für die dieser Arbeit zugrunde liegenden genetischen Untersuchungen zur Verfügung, wofür ebenfalls gedankt sei.

einem Leitz-Reprovit II mit einem Adox KB 14-Film aufgenommen. Für mikroskopische Untersuchungen stand ein Seibert-Mikroskop mit den Objektiven 10-, 30- 65mal und den Okularen 4-, 10- und 15mal zur Verfügung.

C. Experimenteller Teil

I. Die normale Blüte von Antirrhinum majus L. *Sippe 50*

Es hat sich als notwendig erwiesen die Entwicklung einer normalen Blüte von *Antirrhinum majus* L. genauer zu beschreiben, weil in der Literatur abweichende Darstellungen vorhanden sind und dadurch ein Vergleich mit den Mutanten erschwert wird.

1. Morphologie der Blüte. Wie bei vielen anderen Dikotylen auch wechselt bei *Antirrhinum majus* die Blattstellung nach der Infloreszenz hin von der dekussierten in die spiralige oder schraubige Anordnung über (vgl. Breindl 1934). Die Blüten selbst werden in den Achseln von schuppenartigen Deckblättern angelegt. Die beiden Vorblätter sind bei *Antirrhinum* unterdrückt; bei *Scrophularia* und *Lophospermum* sind sie beispielsweise noch vorhanden. Die Blüten, die deutlich dorsiventral ausgebildet sind, haben eine geförderte Unterseite, wie es bei Blüten mit aufsteigender Deckung der Kelchblätter häufiger vorkommt. Die fünf Kronblätter, von denen die drei abaxialen die Unterlippe, die zwei adaxialen die Oberlippe bilden, sind zu einer Röhre verwachsen. Von den fünf mit den Kronblättern alternierenden Staubblättern bleibt das hintere, mediane reduziert. Die Theken werden ursprünglich intrors angelegt, jedoch behalten nur die beiden nach der Oberlippe zu gelegenen Staubblätter ihre ursprüngliche Lage bei, während die beiden abaxialen im Laufe der Blütenentwicklung eine Torsion um 180° erfahren, so daß sie in der fertigen Blüte gleichgerichtet mit den hinteren liegen. In dem meist zweikammerigen Fruchtknoten liegen die Placenten zentral-winkelständig. Die Blüte erreicht im vollaufgeblühten Zustand eine durchschnittliche Länge von 3,5 cm. Terminale Endblüten kommen bei *Antirrhinum*, wie bei den Scrophulariaceen allgemein, selten vor und sind dann meist radiär.

2. Entwicklung der Blüte. Das Blütenprimordium wird als kleiner Höcker etwas vom Deckblatt distanziert angelegt. Mit zunehmender Größe rückt es bald in dessen Achsel, nimmt eine längliche Form an und ist stark gewölbt. Mit den Längsseiten liegt es parallel zum Deckblatt. Als erste Anlage bilden sich auf ihm die Höcker der Kelchblätter. Im Gegensatz zu allen folgenden Blütenkreisen läßt sich bei dem Staubblattkreis die Reihenfolge der Blattanlage gut verfolgen. Nachdem das Blütenprimordium ganz in die Achsel des Deckblattes gerückt ist, werden auf der abaxialen Seite die beiden vorderen Kelchblätter ausgebildet. Diese nehmen die ganze Vorderseite der jungen Blütenknospe in Anspruch. Sind sie deutlich zu erkennen, wird nach den Außenrändern der oberen Längsseiten hin je ein weiteres Kelchblatt angelegt und nur wenig später zwischen diesen eins, das genau in der Mediane zu liegen kommt (vgl. Abb. 1). Die beiden abaxialen eilen den drei anderen im Wachstum voraus. Die Kelchblätter bedecken bis zum Beginn des Streckungswachstums der einzelnen Blütenorgane die gesamte Blütenanlage. Diese Reihenfolge der Kelchblattanlage weicht von der von Sirks (1915) für *Antirrhinum majus* beschriebenen etwas ab. Nach Sirks entstehen nämlich zunächst die beiden seitlichen hinteren Kelchblätter, anschließend, fast gleichzeitig das median hintere, der Achse nahe gelegene, und erst dann die beiden vorderen.

Solange nur die Kelchblätter angelegt sind, behält die Blütenanlage die oben beschriebene längliche Form bei. Sie beginnt sich aber bald zu verbreitern, wird flacher, und die junge Knospe nimmt zu dem Zeitpunkt, an dem die ersten Kronblattanlagen zu erkennen sind, die Form eines Fünfeckes an, das mit der Spitze zum Deckblatt hinzeigt und an dessen Seiten je ein Kelchblatt liegt (vgl. Abb. 2). In den Ecken des Fünfeckes, also alternierend mit den Kelchblättern, werden die Kronblätter angelegt. Sie erscheinen alle fünf fast gleichzeitig, doch kann man bei genauerem Betrachten feststellen, daß zuerst die beiden hinteren Kronblätter angelegt werden, die später die Oberlippe bilden, anschließend die drei vorderen. Also in der umgekehrten Reihenfolge wie die Kelchblätter. Die anfangs kegeligen Kronblattanlagen wachsen sofort, nachdem sie als Anlage deutlich erkennbar sind, an ihrer Basis in die Breite. Sie nehmen dadurch eine dreieckige Form an (vgl. Abb. 3). Das vordere, mediane Kronblatt kann anfänglich den beiden benachbarten an Größe voraus sein, doch gleichen sich die Größenunterschiede bald wieder aus. Die Bildung der Ober- bzw. Unterlippe

erfolgt nicht gleichzeitig. Zuerst besitzen die drei abaxialen Petalen eine gemeinsame Basis und erst später die beiden adaxialen. Kurz darauf erfolgt dann die Schließung der beiden Teile zu einer Röhre.

Fast gleichzeitig mit den Kronblättern bilden sich die Staubblätter aus. Sie werden alternierend mit den Kronblättern angelegt, decken sich also mit den Kelchblättern (vgl.

Abb. 1.

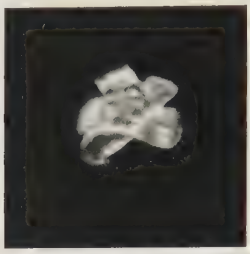


Abb. 2.

Abb. 3.

Abb. 1. Ausbildung der Kelchblätter. 28:1
Abb. 2. Junge Knospe mit ausgebildetem Kelchblattkreis, Kronblatt- und Staubblattanlagen. 28:1
Abb. 3. Ausbildung der Karpelle in einer normalen Blüte. 17:1

Abb. 2, 4). Sie wachsen anfangs sehr schnell, so daß sie in den frühen Stadien die Kronblätter überragen. Gleich von Beginn der Staubblattbildung an ist zu erkennen, daß das fünfte, mediane, in der Entwicklung zurückbleibt. Es wird schon etwas verzögert angelegt. Die vier

Abb. 4. Ältere Knospe einer normalen Blüte. 8:1

später fertilen Staubblattanlagen sind bis zu dem Entwicklungsstadium, an dem die Kronblätter alle eine gemeinsame Basis haben und eine Röhre bilden, größer als die Kronblattanlagen, mindest aber gleich groß. In der Folgezeit vergrößern sich die Kronblätter über die Staubblätter hinaus. Das fünfte, mediane Staubblatt wächst noch eine Zeit verzögert mit, stellt aber bald sein Wachstum ein.

Häufig findet man in den Blüten von *Antirrhinum majus* staminodiale Fäden. Meist sind es zwei, beiderseits des reduzierten Staubblattes. Mitunter kann auch ein derartiger Faden am Grunde eines fertilen vorkommen. Ihrer Stellung nach sind sie als Nebenblatt-

gebilde der Staubblätter aufzufassen. Ab und zu kann von dem unteren Fruchtblatt eine wulstförmige Diskusschuppe liegen.

Zu dem Zeitpunkt, an dem die Lippenbildung beginnt, bilden sich auch die ersten Anlagen des Gynäceums aus. Zur gleichen Zeit bemerkt man bei den Staubblattanlagen ein Breitenwachstum, das zur Bildung der Theken führt. Die Thekenbildung ist äußerlich abgeschlossen, wenn sich die Kronblätter über den Staubblattkreis hinwegschieben. Die für eine pentamere Blüte zu erwartende Ausbildung des Gynäceums aus fünf Karpellen unterbleibt. Statt dessen bilden sich zwei halbringförmige Wülste, die im zentralen Teil der Blütenanlage senkrecht zur Medianachse liegen, also ungefähr parallel zum hinteren Kelchblatt. Diese Anlagen der Fruchtblätter verwachsen sehr bald an ihren Rändern. Von den Verwachsungsnähten aus bilden sich zur Blütenmitte hin Septen aus. Über dem Fruchtknoten verengt sich die von den Karpellen gebildete Röhre zum Griffel, der dann mit der Narbe abschließt.

Es ist hier angezeigt die Entwicklung einer normalen Scrophulariaceenblüte zum Vergleich anzuführen, zumalen sich die von Payer beschriebene Entwicklung einer Scrophulariaceenblüte nicht mit der vorher beschriebenen Entwicklung der *Antirrhinum*blüte deckt. Nach Payer (1875) entwickeln sich von den fünf Kelchblättern, denen er eine 2/5-Stellung zuschreibt, zuerst die beiden hinteren seitlichen. Nach seinen Angaben wächst dann das hintere, mediane schnell heran, ihm folgen die beiden benachbarten, während sich die vorderen zwei weniger schnell entwickeln. Der Blütenboden ist zu diesem Zeitpunkt stark nach außen geneigt. Alternierend mit den Kelchblättern entstehen die Kronblätter, zuerst die beiden hinteren, darauf die beiden vorderen seitlichen und schließlich das mediane. In den Lücken der Blütenblätter bilden sich hierauf die Staubblätter. Von ihnen wird zuerst das mediane, hintere sichtbar, danach die benachbarten seitlichen und zuletzt die beiden vorderen. Das mediane Staubblatt wächst zunächst etwas stärker, bleibt aber dann hinter den vier anderen zurück und wird zum Staminodium. Nach der Anlage der Staubblätter bilden sich schließlich die median gelegenen Fruchtblätter aus.

Die Abweichungen in der *Antirrhinum*blüte von diesem Grundtyp beziehen sich sowohl auf die Reihenfolge der Anlage und auf das Wachstum der Kelchblätter als auch auf die Entwicklung des fünften, medianen Staubblattes. Bei Blüten mit aufsteigender Deckung der Kelchblätter ist häufig die Blütenunterseite gefördert. Bei der vorher beschriebenen *Antirrhinum*blüte sind nicht nur die Kelch- und Kronblätter der Unterseite gefördert, sondern auch die beiden abaxialen Staubblätter und das untere Fruchtblatt. Ebenso haben wir bei *Antirrhinum*, was bei Scrophulariaceen häufig ist, auf der geminderten Seite Verkümmerung eines oder mehrerer Glieder des Andröceums. Durch die Hemmung des fünften Staubblattes und durch das Zurückbleiben der seitlich von diesem gelegenen Staubfäden entsteht bei *Antirrhinum majus* das bekannte didynamische Andröceum, wie wir es ebenso bei *Scrophularia* und *Linaria* haben.

II. Antirrhinum majus L. *mutatio radialis*

Sirks untersuchte auch die Entwicklungsgeschichte der radiären Blüte von *Antirrhinum majus*. Allerdings weichen seine Befunde etwas von den meinigen ab.

Nach Sirks entwickelt sich die radiäre Blüte wie folgt: Der Kelch entsteht wie bei einer normalen, von ihm untersuchten, dorsiventralen Blüte. Dagegen trat bei den Kronblättern eine ausgesprochene 2/5-Stellung auf. Als erstes Kronblatt erscheint das vordere linke, als zweites das rechte hintere, als drittes das mediane, danach das linke hintere und zuletzt das vordere rechte.

Nach meinen Beobachtungen weicht die Reihenfolge der Anlage der einzelnen Blütenorgane keineswegs von der einer normalen, in dieser Arbeit beschriebenen Blüte ab. Da keine Blütenseite gefördert ist, verwachsen alle fünf Kronblätter fast gleichzeitig zu einer Röhre. Sie wachsen dann alle gleich lang und gleich schnell weiter. Ebenso sind im Gegensatz zu einer normalen Blüte die Stamina gleich lang und die Theken intrors gerichtet. Das fünfte, mediane Staubblatt bleibt auch hier reduziert. Das typische Aussehen bekommt die Mutante dadurch, daß bei ihr alle fünf Kronblätter ähnlich dem fünften, medianen in dorsiventralen Blüten ausgebildet sind.

III. Antirrhinum majus L. *mutatio plena*

Diese Mutante trat in einem Versuch mit m/100 Äthylurethan + KCl auf. Sie ist eine reine Blütenmutante und wurde als solche von KUCKUCK und SCHICK 1930 beschrieben. Als Mutante ist sie erst dann zu erkennen, wenn die Blüten geöffnet sind. Diese fallen vor allem durch eine merkwürdige Sperrung der Lippen auf, die darauf zurückzuführen ist, daß im Blüteninneren petaloide Organe ausgebildet werden. Im Gegensatz zu Kelch- und Kronblattkreis, deren Ausbildung normal erfolgt, weichen die inneren Blütenkreise stark von der charakteristischen Form ab.

Die Anlage der Kelchblätter erfolgt wie in einer normalen Blüte in einer aufsteigenden Reihenfolge und ihre Entwicklung verläuft auch weiterhin normal. Ebenso verhält es sich mit den Kronblättern. Dagegen zeigen die Staubblätter, deren Anlage normal erfolgt, schon in einem relativ frühen Stadium Abweichungen. Sie werden alternierend mit den Kronblättern angelegt. Anlage und Entwicklung des fünften, medianen Staubblattes ist wie in einer normalen Blüte verzögert. Gleich nach der Anlage wachsen die Staubblätter etwas stärker als die Kronblätter, beginnen sich dann, außer dem fünften, medianen, an ihren oberen Enden zu verdicken und Theken auszubilden. In einer normalen Knospe ist die dreieckige Antherenanlage sehr deutlich vom schmaleren Filament abgesetzt. Hier dagegen ist das Konnektiv sehr verbreitert, so daß ein allmählicher Übergang in das Filament hinein stattfindet. In dem zuletzt genannten Stadium bemerkt man auch, daß das fünfte, mediane Staubblatt nicht mehr weiter in seiner Entwicklung gehemmt bleibt. Es bildet zwar keine Theken mehr aus, aber eine Verdickung des oberen Endes könnte man als erste solche Anlage deuten.

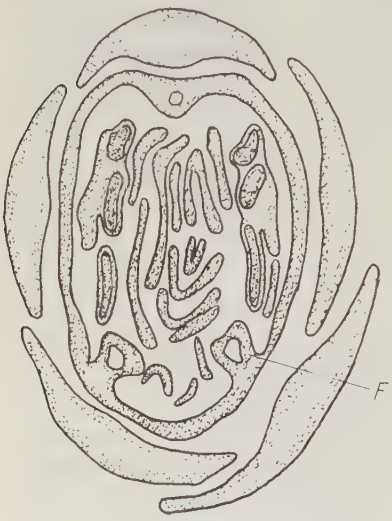


Abb. 5. Querschnitt durch eine Knospe der Mutante *plena*. *F* mit den Kronblättern verwachsene Filamente. 12:1

Sobald die Kronblätter sich an der Basis berühren, verwachsen die Filamente der Staubblätter der Unterlippe, seltener auch die seitlichen Staubblätter der Oberlippe mit den Kronblättern und zwar so, daß jeweils ein Filament mit der Verwachsungsnaht zweier Kronblätter zusammenfällt (vgl. Abb. 5). Die Antheren werden dadurch in ihrer Lage fixiert und sind im Gegensatz zu denen in der normalen Blüte intrors gerichtet. Das fünfte Staubblatt verwächst ebenfalls mit der Verwachsungsnaht der Oberlippenkronblätter und dies kann es solange mit diesen bleiben, wie es die Kronblätter der Oberlippe selbst sind. Die starke Förderung der Unterlippenstaubblätter wie in der normalen Blüte, ist bei dieser Mutante nicht mehr möglich. Die Filamente sind außerdem bandförmig und über ein breites Konnektiv mit den Theken verbunden.

Auffällig sind vor allem noch in dieser Blüte die vielen staminodialen Fäden. In aufpräparierten Blüten fallen sofort die beiden rechts und links von dem fünften Staubblatt liegenden auf. Diese beiden sterilen Fäden und das fünfte Staubblatt haben eine gemeinsame Basis, woraus man schließen kann, daß jene

Nebenblattbildungen der Staubblätter sind. Die sterilen Fäden erreichen meist $^3/_4$ der Größe der Staubblätter (Abb. 6). Ebenso regelmäßig wie am oberen Staubblatt tritt auch zwischen den beiden abaxialen Staubblättern ein derartiger Faden auf. Diese drei eben beschriebenen brauchen aber nicht immer die einzigen zu sein. An den seitlichen Staubblättern können ebenfalls noch ein bis zwei inseriert sein. Sie alle tragen aber nur wenig mit zur Füllung der Blüte bei. Diese wird, wie schon anfangs erwähnt, durch etwas anderes hervorgerufen.

Wenn die gesamte Knospe ungefähr $^3/_4$ cm groß ist, wachsen aus dem verbreiterten Konnektiv kleine Höcker hervor, die dann zu unregelmäßig geformten

Abb. 6. Ältere Knospe der Mutante *plena* mit zahlreichen staminoidalen Fäden. 12:1

Läppchen auswachsen. Zuerst bemerkt man die Höcker an den abaxial gelegenen Staubblättern, später erst bei den adaxialen. Infolgedessen werden bei diesen die Blättchen nicht ganz so groß. Sie färben sich auch wie die Kronblätter rot und weiß-gelb, wobei das Rot hauptsächlich an den Randpartien auftritt. Auch am fünften, medianen Staubblatt werden Läppchen ausgebildet, die aber klein bleiben und sich nicht so stark färben. Während der Querschnitt eines normalen Filamentes rund ist und einen zentral liegenden Gefäßstrang zeigt, ist er bei dieser Mutante bandförmig und statt eines Gefäßstranges haben wir deren fünf bis sechs über dem ganzen Querschnitt verteilt liegen.

Im Gynäceum werden drei bis fünf Karpelle angelegt und bis zu einer gewissen Größe ausgebildet. Sie sind in der fertigen Blüte nur bis zur Hälfte ihrer Gesamtlänge verwachsen, dann trennen sie sich und laufen in schmalen Zipfeln aus. Das Ganze wird nicht viel über $^1/_2$ cm groß. Innerhalb des Fruchtknotens bilden sich statt Samenanlagen grüne Blättchen aus. Schneidet man eine ältere Knospe

quer und zwar in der oberen Region des Fruchtknotens, so sieht man, daß höchstens die äußeren, die Außenwand des Fruchtknotens bildenden Blättchen miteinander verwachsen sind. Die im Inneren liegenden sind alle getrennt, haben einen verschieden starken Querschnitt und scheinen ziemlich regellos angeordnet zu sein. Eine bestimmte Reihenfolge bzw. Deckung der Blättchen kann man nicht erkennen. Ein Längsschnitt durch eine derartige Knospe zeigt, daß sich die Blättchen doch knospenartig überdecken und im Inneren einen Vegetationskegel einschließen, der offensichtlich funktionsfähig ist und neue Blättchen anlegen kann (vgl. Abb. 7). BAUR (1930) hatte schon beobachtet, daß ein derartiger Fruchtknoten wieder durchtrieb.

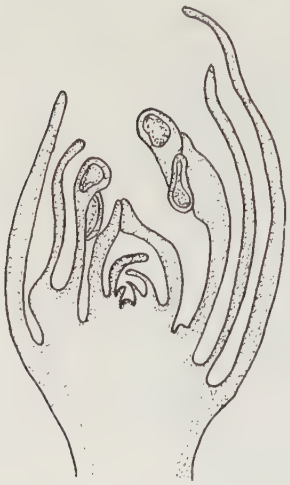


Abb. 7. Längsschnitt durch eine Knospe der Mutante *plena*. 12:1

IV. Antirrhinum majus L. *mutatio viridiflora*

1. Morphologie der Blüte. 1953 trat in einer durch Selbstung erhaltenen Nachkommenschaft von S 91 D (Sippe 50) die Mutante *viridiflora* auf; beschrieben 1930 von KUCKUCK und SCHICK. Sie unterscheidet sich im Wuchs und in der Blattform nicht von einer normalen Pflanze. Man kann sie erst erkennen, wenn sich die Kronblätter aus dem Kelchblattkreis hervorschieben. Bei einer normalen Blüte legen sich die beiden verwachsenen Kronblätter der Oberlippe über die Unterlippe, bei der Mutante dagegen sind die Kronblätter nicht verwachsen und ragen getrennt aus dem Kelchblattkreis hervor. In einer erwachsenen Blüte sind die drei abaxialen Petalen wesentlich kürzer als die beiden, die die Oberlippe bilden. Während die Petalen der Unterseite fast durchweg weiß sind, sind die nach unten gerichteten Zipfel der oberen Petalen an ihren vorderen Enden grün gefärbt. Eine Rotfärbung wie bei normalen Pflanzen tritt nirgends auf. Zwischen den Petalen der Oberlippe, die ziemlich nach den Seiten verschoben sind, ragt ein Griffel heraus, an dem keine ausgesprochene Narbe zu erkennen ist. Man kann an ihm makroskopisch die Verwachsungsnähte von fünf Blättern, nicht eigentliche Fruchtblätter, wie später noch gezeigt wird, aus denen er gebildet wird, erkennen. Die gesamte Blüte wird nicht größer als 1,5 cm, im Gegensatz zu einer normalen, die 3,5 cm lang wird.

2. Entwicklung der Blüte. Die ersten Anlagen der beiden äußeren Kreise erfolgen wie in einer normalen Blüte. Die Kelchblätter werden in einer aufsteigenden Reihenfolge angelegt. Etwas später erfolgt dann in den Achseln der Kelchblätter die Ausbildung der Kronblätter und gleich danach werden alternierend mit diesen die fünf Staubblätter angelegt. Die Kronblattanlagen sind nur an der Basis miteinander verschmolzen. Die Anlage des Staubblattkreises erfolgt so, daß das fünfte, mediane Staubblatt etwas verzögert angelegt wird, jedoch entwickelt es sich nach einer vorübergehenden kurzen Hemmung parallel zu den anderen weiter, kann diese dann später sogar noch überflügeln. Die Staubblattanlagen entwickeln sich nun nicht zu kegelartigen Höckern, aus denen Theken hervorgehen, sondern sie wachsen an der Basis in die Breite und nehmen hufeisenförmige Gestalt an mit der Öffnung nach dem Blüteninneren zu. Sie berühren sich an ihren Rändern und verwachsen miteinander (vgl. Abb. 8, 9). Vor jedem Staubblatt, vor dem fünften etwas geringer, werden so nach dem Blüteninneren zu kleine Ausbuchtungen gebildet. Von den basalen Teilen der Verwachsungsnähte aus bilden sich nun septenartige Wülste zur Blütenachse

hin. Gleichzeitig hebt sich der zentrale Teil der Blütenanlage und durch das Verwachsen der Wülste mit dieser bilden sich Kammern aus, in die von der Blütenachse her höckerförmige Placenten hineinwachsen, auf denen zahlreiche Samenanlagen ausgebildet werden (vgl. Abb. 11).

Abb. 8. Junge *viridiflora*-Knospe. 17:1

Abb. 9. *Viridiflora*-Knospe. Beginnende Fruchtknotenbildung. 11:1

Die fünf miteinander verwachsenen Staubblätter strecken sich in die Länge, verengen sich über den Samenanlagen zu einer griffelartigen Röhre (vgl. Abb. 10),

Abb. 10. Ältere *viridiflora*-Knospe. 6:1

die zu einer solchen Länge heranwachsen kann, daß sie über die oberen Petalen herausragt. Die Verwachsungsnähte der Staubblätter lassen sich bis in die oberste Spitze hinein verfolgen. Eine Ausbildung von Karpellen unterbleibt vollkommen.

Mit dem Beginn des Streckungswachstumes der Kronblätter kann man an der Basis eines jeden Staubblattes eine kleine Wulst erkennen, die an der Verwachsungsnaht der Staubblätter mit diesen verschmolzen sind. Man könnte diese Anlagen ihrer Ausbildung nach als Diskusschuppen bezeichnen. Sie weichen freilich von den bisher bei anderen Scrophulariaceen bekannten Diskusschuppen ab (vgl. S. 787). Die hier gefundenen diskusartigen Wulstbildungen wechseln nämlich nicht mit den Staubblättern ab, wie das häufig bei anderen Scrophulariaceen der Fall ist, sondern sie stehen vor diesen und sind zudem noch mit diesen verwachsen.

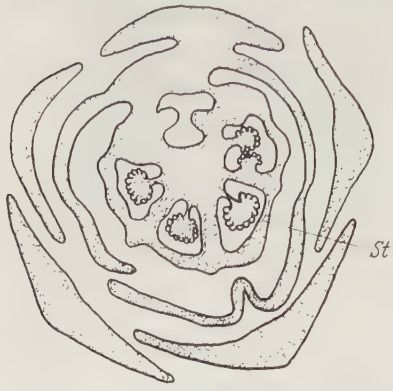


Abb. 11. Querschnitt durch eine *viridiflora*-Knospe. 12:1. *St* Staubblattkreis

Bemerkenswert ist noch das weitere Verhalten des fünften Staubblattes. Es kann im Laufe seiner Entwicklung mitunter kronblattartig ausgebildet werden. Dieser Eindruck wird dadurch hervorgerufen, daß die Verwachsung mit den benachbarten Staubfäden nicht vollständig zu sein braucht, daß ferner der obere Rand nicht wie bei den übrigen Staubblättern verdickt sondern im Gegenteil sehr dünn ist, daß weiter die Außenseite stark behaart ist, wie es bei den Blättern der äußeren Blütenkreise, nicht aber bei den Staubblättern der Fall zu sein pflegt und daß ferner der obere Teil häufig wie ein kleines Blättchen über die anderen Staubblätter hinausragen kann.

V. „Semiviridiflora", eine bisher noch nicht beschriebene Mutante von Antirrhinum majus L.

Bei näherer Kontrolle der Pflanzen der Nachkommenschaft von S 91 D fielen außer der Mutante *viridiflora* noch Pflanzen auf, die zwar im Wuchs normal, aber auf der Ober- und Unterlippe kräftiger rot gefärbt waren und zudem etwas kleinere Blüten hatten. Die aus 60 Pflanzen bestandene Nachkommenschaft spaltete in 36 normale Pflanzen, 12 *viridiflora* und 12 der noch nicht bekannten Mutante.

1. Morphologie der Blüte. Außer in den schon eben erwähnten äußeren Merkmalen unterscheiden sich Kelch und Krone nicht weiter von einer normalen Blüte. Präpariert man aber eine Blüte auf, so fallen einem sofort Unregelmäßigkeiten in der Ausbildung der Stamina, des Griffels und des Fruchtknotens auf. Die Staubblätter sind breit, wirken verbändert und liegen mehr oder weniger verkrümmt um den Fruchtknoten herum, häufig mit diesem verwachsen. Die Theken sind zum Teil stark verkümmert und der Pollen schlecht fertil. Nicht selten sind auch ein Teil der Filamente mit den Kronblättern verwachsen. Neben den Staubblättern sind immer ein bis drei staminodiale Fäden vorhanden.

2. Entwicklung der Blüte. Die anfängliche Blütenausbildung ist weitestgehend normal. Sobald aber die Staubblätter mit der Thekenbildung beginnen, werden in den Achseln der Staubblätter nach dem Blüteninneren zu die Karpelle angelegt und zwar, im Gegensatz zu einer normalen Blüte, fünf statt zwei, die sich gleichmäßig weiterentwickeln. Diese fünf Karpelle bilden einen Fruchtknoten mit fünf Samenkammern aus, die jeweils durch Septen voneinander getrennt sind. Im Laufe der Entwicklung werden meist zwei bis drei dieser Septen reduziert, so daß in der ausgewachsenen Blüte im oberen Teil des Fruchtknotens meist nur drei oder zwei Samenkammern zu erkennen sind (vgl. Abb. 12). Der Griffel wird, wie schon erwähnt, aus fünf Karpellen gebildet, die häufig in

der Griffelregion teilweise getrennt sein können. In derartigen Blüten zeigt der Fruchtknoten insofern noch eine stärkere Abweichung, als mit ihm alle vier thekentragenden Filamente verwachsen sind, während es bei den Blüten, bei denen sich die Karpelle nicht trennen, höchstens zwei, seltener drei sind. Diese Filamente sind nicht stielrund, sondern bandförmig und haben nicht nur ein Leitbündel sondern zwei bis vier über dem gesamten Querschnitt verteilt liegen. Da sie aber nur an den Rändern mit dem Fruchtknoten verwachsen sind, werden so Hohlräume gebildet, in die sich von dem jeweiligen Fruchtblatt her Placenten hinein entwickeln. Die Filamente lösen sich dort vom Fruchtknoten, wo sich dieser zum Griffel verengt. Dadurch geschieht es häufig, daß ein Teil der außerhalb des Fruchtknotens gebildeten Samenanlagen im freien Blütenraum zu liegen kommen. Der Griffel ist bei dieser Mutante bandförmig, parallel zur Mediane ausgerichtet. Man kann gut annehmen, daß er in diese Lage von den seitlichen Filamenten gedrückt worden ist. Berührt der Griffel die Kronblätter der Oberlippe, so können hier Verwachsungen auftreten. An solchen Stellen können auch Placenten mit Samenanlagen ausgebildet werden. Häufig ist der Griffel dann nach dieser Seite zu geöffnet (vgl. Abb. 13).

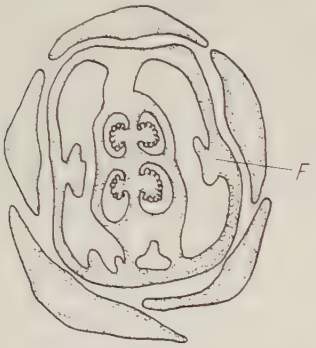


Abb. 12. Querschnitt durch eine Knospe der Mutante *semiviridiflora*. 12:1. *F* mit den Kronblättern verwachsene Filamente

Abb. 13. Ältere Knospe der Mutante *semiviridiflora*. Es ist deutlich der aus fünf Karpellen gebildete Griffel zu erkennen. 6:1

Regelmäßig werden zwischen den beiden Staubblättern der Unterseite zwei sterile, staminodiale Fäden ausgebildet. Sie sind anfänglich noch mit den Staubfäden verwachsen, lösen sich aber bald wieder. Ebenso ist an der Oberseite des Fruchtknotens fast immer ein Staminodium zu beobachten, das sehr groß werden kann.

Diese Mutante nimmt also in ihrer Ausbildungsform eine Zwischenstellung zwischen einer normalen und einer *viridiflora*-Blüte ein.

VI. Antirrhinum majus L. mutatio sterilis

Diese Mutante beschrieb schon Kuckuck und Schick 1930. In unseren Versuchen trat sie in der F_2 von Pflanzen auf, die mit m/100 Äthylurethan + KCl

behandelt wurden. Zu erkennen ist die Mutante erst, wenn sie ihre Infloreszenz entwickelt. Die Knospen bleiben klein und nur an vereinzelten Trieben wurden ein bis vier Blüten entwickelt, deren Staubblätter und Samenanlagen reduziert waren. Aus dem Konnektiv der Staubblätter wuchsen häufig petaloide Läppchen hervor, wie bei der Mutante *plena* auch. Die Petalen bei den aufgetretenen Blüten waren meist getrennt. Die Stellung der Knospen in einer *sterilis*-Infloreszenz ist wie in einer normalen. Die ersten können noch gegenständig sein, doch strecken sich bald die ursprünglichen Nodien, und die Knospen stehen wechselständig. Die ersten Anlagen, gleich unter dem Sproßvegetationskegel, sind nicht von den gleich alten normalen Blütenknospen zu unterscheiden. Die ersten Blattbildungen ähneln im Längsschnitt sehr normalen Kelchblättern. An den vom Sproßvegetationskegel abgegliederten Seitenvegetationskegeln erscheinen die ersten Blattanlagen ebenfalls noch gegenständig. Aber schon in der fünften bzw. sechsten Knospe, von der Spitze an gerechnet, erfolgt eine Streckung der seitlichen Vegetationskegel im Schutze des Deckblattes, so daß die Blattstellung wechselständig wird. In den Achseln dieser Blätter bilden sich wiederum Vegetationskegel, Vegetationskegel dritter Ordnung, wenn man den des Haupttriebes als einen erster Ordnung bezeichnet. Nicht selten treibt eine Knospe innerhalb einer Infloreszenz durch. Regelmäßig geschieht das aber, wenn man von Infloreszenzen Stecklinge macht. Es wächst, wenn sie sich bewurzelt haben, eine dem Sproßvegetationskegel benachbarte Knospe aus. Dieses Austreiben wird eingeleitet durch eine starke Streckung der untersten Zone des sich bildenden Seitentriebes, so daß die ersten Blätter 1—1,5 cm über dem Deckblatt stehen. Weitere Seitentriebe haben die gesteckten Infloreszenzen nicht ausgebildet. Die ersten Blätter, die angelegt werden, stehen noch wechselständig und sind klein, sie haben fast eine Form wie die Keimblätter. Erst ab dem fünften oder sechsten Nodium werden sie laubblattähnlicher. Diese aus Infloreszenzstecklingen gezogenen Pflanzen wachsen zur gleichen Wuchshöhe und -form heran wie die Elterpflanze.

D. Diskussion

1. Genetik. Bei diesen hier untersuchten Mutanten handelt es sich um monohybrid spaltende, bzw. bei den Mutanten *viridiflora* und *semiviridiflora* wahrscheinlich um dihybride Formen. Das heißt also, daß hier eine Beeinflussung des AG-Komplexes stattgefunden hat, die ausschließlich auf kariotische Elemente zurückzuführen ist.

Im Gegensatz dazu konnte OEHLKERS (1938, 1942) an seinen *Streptocarpus*-bastarden zeigen, daß hier nur durch das Zusammenspiel von Plasmon und Genom die reguläre zwittrige Ausbildung der Blüte zustande kommt. Veränderungen dieses Gleichgewichtes, wie es in dem Bastard *Streptocarpus Wendlandii* × *Rexii* vorkommt, führen zu Verweiblichungen, die sich zunächst im Ausfall der Staubblätter und bei weiterem Überwiegen des *Rexii*genoms im *Wendlandii*plasma sogar zur Verweiblichung der Fruchtblätter führt, entsprechend denen, in den vorstehenden Untersuchungen behandelten Mutanten *viridiflora* und *semiviridiflora*. Die gleiche Erscheinung, wie sie OEHLKERS bei seinen *Streptocarpus*bastarden erhielt, trat auch bei der Kreuzung *Digitalis lutea* × *purpurea* auf, die HEILBRONN und NEBAHAT YAKAR (1942) durchführten. Sie erhielten dabei Bastarde, bei denen die Stamina an der Basis Samenanlagen trugen und

an der Spitze in einer mehr oder weniger narbenartigen Papille endeten. Diese Ausbildungsform nahm aber bei später angelegten Blüten der gleichen Infloreszenz ab. Die Stamina bildeten zwar noch Samenanlagen aus an der Basis aber zudem noch, statt der Papillen, Antheren. Ähnlich verhielten sich auch zwei Pflanzen einer aus 20 Pflanzen bestehenden F_1-Inzuchtgeneration von *Digitalis lanata*, die Schwerdtfeger (1951) beschrieb.

Während vollständig verweiblichte Pflanzen häufig auftreten und auch relativ leicht zu erhalten sind, treten vermännlichte Formen seltener auf. Oehlkers erhielt zwar bei der Kreuzung *Streptocarpus Rexii* × *Wendlandii* vermännlichte Formen, das ging aber nie soweit, daß der gesamte weibliche Teil der Blüte eliminiert wurde, sondern es wurde nur die Fertilität der Samenanlagen herabgesetzt. Es erhebt sich die Frage, ob die Mutante *plena* überhaupt als eine in dem Sinne vermännlichte Pflanze aufzufassen ist. Der weibliche Teil der Blüte ist hier deshalb ausgefallen, weil zu einem bestimmten Zeitpunkt der Blütenentwicklung diese unterbrochen wird und die Blüte wieder zur vegetativen Phase zurückkehrt. Es ist nicht so, wie es Oehlkers an den *Streptocarpus*bastarden fand, daß die Fertilität der Samenanlagen herabgesetzt wurde, noch wurde die Anzahl der Staubgefäße vermehrt, wie es Kappert (1955) für die Mutante *neohemiradialis* von *Antirrhinum majus* beschrieb, wobei gleichzeitig das Gynäceum steril wurde. Sondern an Stelle der Fruchtblätter werden grüne Blättchen knospenartig angelegt, die mitunter einen funktionsfähigen Vegetationskegel einschließen können.

2. Blütenphysiologie. Nach dem eben Erwähnten scheint es so zu sein, daß alle Blütenanlagen totipotent sind und daß sie erst nach der Anlage determiniert werden. Unterbleibt dieses, dann entwickeln sie sich zu mehr oder weniger laubblattähnlichen Formen. Die Ursachen, die diese Determination bzw. Nichtdetermination bedingen, kann man ohne weiteres auf entsprechend veränderte Gene zurückführen. Auch bei der Mutante *sterilis* könnte man annehmen, daß die Gene, die die Ausbildung der Blüte bewirken, abgeändert wurden oder gar verlustig gegangen sind. Diese Erklärung ist aber deshalb unzulänglich, weil doch einzelne mehr oder weniger stark mißbildete Blüten an *sterilis*-Infloreszenzen auftreten können. Leichter ließe sich diese Mutante durch die Annahme eines Blühstoffes oder einer Vorstufe desselben interpretieren, dessen Auswirkung durch ein dementsprechend verändertes Gen gehemmt wird. Um Näheres darüber sagen zu können, müßten vor allem solche Versuche unternommen werden, wie sie unter anderem von Melchers (1937, 1939), Lang (1942), Haupt (1954) an einzelnen Objekten bereits durchgeführt wurden.

3. Entwicklungsgeschichte und Morphologie. Bei einigen Blütenmutanten traten in entwicklungsgeschichtlicher Hinsicht insofern einige bemerkenswerte Erscheinungen auf, als Blütenkreise, die in jeder normalen *Antirrhinum*blüte ausgebildet werden, unterdrückt sind oder einzelne Blütenteile, die in einer normalen Blüte nicht entwickelt sind, ausgebildet werden. In dieser Hinsicht weicht von einer normalen Blüte am stärksten die Blüte der Mutante *viridiflora* ab. Die Scrophulariaceenblüte ist im allgemeinen pentamer, d. h. allen Blütenkreisen kommen je fünf Blätter zu. Das eine oder andere Blättchen kann in der Ausbildung gehemmt sein oder ganz wegfallen. Bei der Mutante *viridiflora* fallen die Fruchtblätter ganz aus und den Schutz der Samenanlagen übernehmen

die Staubblätter, die sich hierbei wie die Fruchtblätter verhalten. Nur verlieren sie hierbei die Fähigkeit, Theken auszubilden, und ein Pollenschlauchwachstum ist in dem griffelartig verengten oberen Teil der Staubblätter nicht möglich. Bemerkenswert ist ferner noch, daß nicht nur vier, sondern fünf Staubblätter entwickelt werden und an der Fruchtknotenbildung beteiligt sind. Ebenso entwickelt sich auch bei der Mutante *plena* nach einer vorübergehenden Hemmung das fünfte Staubblatt weiter. Daß alle fünf ausgebildet werden können, ist bei Scrophulariaceen nicht selten, z. B. bei einzelnen *Verbascum*pflanzen.

Worauf die Ausbildung von nur zwei Karpellen zurückzuführen ist, bleibt noch ungeklärt. Der Lage nach kann eine Verschmelzung der Anlagen in einem sehr frühen Entwicklungsstadium erfolgt sein, wie wir es im Laufe der Blütenentwicklung auch bei den Kronblättern beobachten. Der Raum, der den Karpellen zur Verfügung steht, ist sehr begrenzt, so daß sich die Fruchtblattprimordien der adaxialen Seite und die der abaxialen Seite, entsprechend der herrschenden Dorsiventralität, von Anfang an berühren und miteinander verwachsen. Daß dem Fruchtblattkreis auch fünf Blätter zukommen, zeigt die Mutante *semiviridiflora* deutlich. Bei ihr sind die Anlagen der Karpelle etwas weiter nach dem Staubblattkreis hin verschoben. Dadurch verwachsen bei dieser Mutante leicht die Filamente mit dem sich entwickelnden Fruchtknoten. Den Karpellen steht aber dadurch mehr Raum zur Verfügung und sie legen sich einzeln an, ehe sie fast gleichzeitig miteinander verwachsen.

Einer strittigen Frage, die in morphologisch-entwicklungsgeschichtlicher Hinsicht von Interesse ist, nämlich der Frage nach der Herkunft der Blütenblätter, konnte kein neues Material, das ihrer Lösung zugute käme, erbracht werden. Bei den vorliegenden Untersuchungen ließ es sich nur zeigen, daß die Staubblätter einmal zu petaloiden Organen werden können, das andere Mal zu Karpellen. Ferner, daß die Blütenbildung keine Alles- oder Nichts-Reaktion ist, sondern daß sie stufenweise vor sich gehen kann und daß die Blüte während der Entwicklung wieder zur vegetativen Phase zurückkehren kann.

Zusammenfassung

Die in der vorliegenden Arbeit vorgenommenen entwicklungsgeschichtlichen Untersuchungen an einigen Blütenformmutanten der Sippe 50 von *Antirrhinum majus* L. ergaben folgende Resultate:

1. Die Blüten der Mutante *plena* kehren in einem bestimmten Entwicklungsstadium wieder zur vegetativen Phase zurück, was sich am Ausfall des Gynäceums und Bildung von grünen Blättchen an dessen Stelle anzeigt.

2. Bei der Mutante *viridiflora* werden keine Karpellen ausgebildet. An ihre Stelle treten die Stamina, die keine Antheren mehr ausbilden können.

3. Die Mutante *semiviridiflora* nimmt eine Mittelstellung zwischen einer normalen Sippe 50-Blüte und der Blüte der Mutante *viridiflora* ein.

4. Die Mutante *sterilis* bildet zwar noch eine Infloreszenz aus, aber die Ausbildung von Blüten unterbleibt bis auf einige wenige mehr oder weniger stark mißbildete. Stecklinge aus Infloreszenzen wachsen ohne weiteres zu neuen *sterilis*-Pflanzen heran.

5. Es wurden in genetischer, blütenphysiologischer und entwicklungsgeschichtlicher Hinsicht bemerkenswerte Abweichungen der Blütenformmutanten vom Normalfall diskutiert und bei einigen die Möglichkeit einer „Blühstoff"-wirkung in Betracht gezogen.

Literatur

Breindl, M.: Zur Kenntnis der Baumechanik des Blütenkelches der Dikotylen. Bot. Arch. **36**, 191—168 (1934). — Eichler, A. W.: Blütendiagramme. Leipzig 1875. — Elias, H.: Entwicklungsgeschichtliche Trickfilme nebst Bemerkungen über die Verwendung des *Semper*-Präparates in der Botanik. Ber. freien Vereinigg Pflanzengeogr. u. system. Bot. **71** (1929). — Goebel, K.: Vergleichende Entwicklungsgeschichte der Pflanzenorgane. Berlin 1884. — Organographie der Pflanzen, Teil 1. Jena: Gustav Fischer 1928. — Haupt, W.: Die stoffliche Beeinflussung der Blütenbildung bei *Pisum sativum*. I. Die Wirkung der Stickstoffernährung. Ber. dtsch. bot. Ges. **67**, 75—83 (1954). — Die Übertragung blühfördernder Prinzipien bei *Pisum sativum* durch Pfropfung. Z. Bot. **42**, 125—134 (1954). — Heilbronn, A., et Nebahat Yakar: Gynodiözie und Intersexualität als Folge der Bastardierung zwittriger Species. Rev. Fac. Sci. Univ. Istanbul **7** (1942). — Kappert, H.: Untersuchungen über Plasmonwirkung bei *Aquilegia* (Gynodiözie-Heterosis-Gestalt des Sporns). Flora (Jena) **37**, 95—108 (1942). — Einige für Evolutionsfragen interessante Mutationen bei *Matthiola*. Ber. dtsch. bot. Ges. **67**, 413—422 (1955). — Knapp, E.: Die Bezeichnung der Gene von *Antirrhinum majus* nebst einigen Bemerkungen zur genetischen Nomenklatur und Begriffsbildung. Z. Vererbungslehre **84**, 213—250 (1941). — Kuckuck, H., u. R. Schick: Die Erbfaktoren von *Antirrhinum majus* und ihre Bezeichnung. Z. Vererbungslehre **56**, 51—83 (1930). — Lang, A.: Übertragung der Hemmwirkung der Blätter auf die Blütenbildung bei *Hyoscyamus niger* in Kurztagsbedingungen durch Pfropfung. Naturwiss. **30**, 38/39 (1942). — Melchers, G.: Die Wirkung von Genen, tiefen Temperaturen und blühenden Pfropfpartnern auf die Blühreife von *Hyoscyamus niger* L. Biol. Zbl. **57**, 568—614 (1937). — Die Blühhormone. Ber. dtsch. bot. Ges. **57**, 29—48 (1939). — Melchers, G., u. A. Lang: Die Physiologie der Blütenbildung. Biol. Zbl. **67**, 105—174 (1948). — Napp-Zinn, K.: Thermostabile und thermolabile Zwischenstadien im Vernalisationsprozeß. Ber. dtsch. bot. Ges. **56**, 363—368 (1953). — Nelson, E.: Gesetzmäßigkeiten der Gestaltswandlung im Blütenbereich. Ihre Bedeutung für das Problem der Evolution. Chernex-Montreux: Nelson 1954. — Oehlkers, Fr.: Bastardierungsversuche in der Gattung *Streptocarpus* Lindley. I. Plasmatische Vererbung und die Geschlechtsbestimmung von Zwitterpflanzen. Z. Bot. **32**, 305—393 (1938). — Neue Untersuchungen zum Problem der außerkariotischen Vererbung. Z. Vererbungslehre **84**, 213—250 (1952). — Payer, J. B.: Organogénie de la fleur. Paris 1857. — Rothe, H.: Morphologisch-entwicklungsgeschichtliche und genetische Analyse einer sich variabel manifestierenden Mutation von *Antirrhinum majus* L. Z. Vererbungslehre **84**, 74—132 (1951). — Schick, R., u. H. Stubbe: Die Gene von *Antirrhinum majus* II. Z. Vererbungslehre **62**, 249—290 (1932). — Die Gene von *Antirrhinum majus* III. Z. Vererbungslehre **66**, 452—462 (1934). — Schwerdtfeger, G.: Abweichungen im Blütenbau bei *Digitalis lanata*. Ber. dtsch. bot. Ges. **67**, 248—252 (1954). — Sirks, M. J.: Die Natur der pelorischen Blüte. Z. Vererbungslehre **14**, 71—79 (1915). — Stein, E.: Über einige Pfropfversuche mit erblichen, durch Radiumbestrahlung erzeugten Varianten von *Antirrhinum majus*, *Antirrhinum siculum* und *Solanum lycopersicum*. Biol. Zbl. **59**, 59—78 (1939). — Über die Blühfähigkeit von *Antirrhinum siculum mut. sterilis*. Biol. Zbl. **60**, 165—174 (1940). — Troll, W.: Zur Frage nach der Herkunft der Blütenblätter. Flora (Jena) **122**, 57—75 (1927). — Vöchting, H.: Über die Zygomorphie und deren Ursachen. Jb. wiss. Bot. **17**, 297—346 (1886). — Wettstein, F. v.: Gesichertes und Problematisches zur Geschlechtsbestimmung. Ber. dtsch. bot. Ges. **54**, 23 (1936). — Die genetische und entwicklungsphysiologische Bedeutung des Cytoplasmas. Z. Vererbungslehre **73**, 349—366 (1937).

Rainer Bergfeld, Botanisches Institut der Universität Freiburg i. Br.

Autorenverzeichnis des 87. Bandes

Anders, G., Untersuchungen über das pleiotrope Manifestationsmuster der Mutante *lozenge-clawless* (lz^{cl}) von *Drosophila melanogaster*. S. 113

— F., Über Ausbildung und Vererbung der Körperfarbe bei *Gammarus pulex* ssp. *subterraneus* (Schneider), einer normalerweise pigmentlosen Höhlenform des gemeinen Bachflohkrebses. S. 567

Auerbach, C., Analysis of the mutagenic action of formaldehyde food. III. Conditions influencing the effectiveness of the treatment. S. 627

Berg, B. s. Kühn, A. S. 25, 335

Bergfeld, R., Entwicklungsgeschichtliche Untersuchungen an einigen Blütenformmutanten der Sippe 50 von *Antirrhinum majus L.* S. 784

Bertschmann, M., Versuche zur phänokopierenden Wirkung von Chemikalien (Nitrogen-Mustard u. a.) bei *Drosophila melanogaster*. S. 229

Bresch, C., und Th. Trautner, Die Bedeutung des Zweifarb-Nährbodens für genetische Untersuchungen am Bakteriophagen T 1. S. 590

Bochnig, V., Entwicklungsphysiologische und biometrische Untersuchungen an DDT-sensiblen und resistenten Stämmen von *Drosophila melanogaster*. S. 694

Chrometzka, P., Zur Kenntnis der Morphologie und des Wuchsstoffverhaltens der *Oenothera hybrida* Mut. *helix*. S. 267

Counce, S. J., Studies on female-sterility genes in *Drosophila melanogaster*. I. The effects of the gene *deep orange* on embryonic development. S. 443

– Studies on female-sterility genes in *Drosophila melanogaster*. II. The effects of the gene *fused* on embryonic development. S. 462

— Studies on female-sterility genes in *Drosophila melanogaster*. III. The effects of the gene *rudimentary* on embryonic development. S. 482

Egelhaaf, A., Die fluoreszierenden Stoffe in den Organen dreier Genotypen von *Ephestia kühniella*. Beitrag zur Analyse von Genwirkungen in Pterin- und Tryptophanstoffwechsel. S. 769

Esser, K., Die Incompatibilitätsbeziehungen zwischen geographischen Rassen von *Podospora anserina* (Ces.) Rehm. 1. Die genetische Analyse der Semi-Incompatibilität. S. 595

Esser, K., und J. Straub, Kurze Mitteilung. Fertilität im Heterocaryon aus zwei sterilen Mutanten von *Sordaria macrospora* Auersw. S. 625

Fabergé, A. C., The analysis of induced chromosome aberrations by maize endosperm phenotypes. S. 392

Falconer, D. S., and A. Robertson, Selection for environmental variability of body size in mice. S. 385

Fox, A. S., Paper chromatographic studies of the effects of the *Lozenge* pseudoalleles on free amino acids and peptides in *Drosophila melanogaster*. S. 554

Gottschalk, W., Die Paarung homologer Bivalente und der Ablauf von Partnerwechseln in den frühen Stadien der Meiosis autopolyploider Pflanzen. S. 1

Green, M. M., and K. C. Green, A cytogenetic analysis of the lozenge pseudoalleles in *Drosophila*. S. 708

— s. Green, K. C. S. 708

Hadorn, E., und I. Schwinck, Fehlen von Isoxanthopterin und Nicht-Autonomie in der Bildung der roten Augenpigmente bei einer Mutante ($rosy^2$) von *Drosophila melanogaster*. S. 528

Hoffmann, A., Untersuchungen über die Geschlechtsdifferenzierung bei haploiden und diploiden Gametophyten von *Bryum capillare* L. S. 753

Hündler, M. s. Richter, H. S. 85

Ihm, P., Statistische Methoden zur Untersuchung der Ausbreitung von Organismen. S. 36

Kaplan, W. D., and S. R. Pelc, Autoradiographic studies of *Drosophila* gonads following feeding of ^{14}C labelled formaldehyde. S. 356

Khishin, A. F. E., The response of the immature testis of *Drosophila* to the mutagenic action of X-rays. S. 97

Knapp, E., und E. Möller, Tetradenanalytische Auswertung eines 3-Punktversuchs bei *Sphaerocarpus donnellii* Aust. S. 298

Knight, G. R., Chromosome number and morphology of *Drosophila silvestris* Basden — with a descriptive note on the internal genitalia of the adults. S. 439

Kroh, M., Genetische und entwicklungsphysiologische Untersuchungen über die Selbststerilität von *Raphanus raphanistrum*. S. 365

Kühn, A., Der Faktor *ml* (musterlos) in Kombination mit anderen mutierten Faktoren von *Ephestia kühniella*. S. 580

— u. B. Berg, Zur genetischen Analyse der Mutation *Biochemica* von *Ephestia kühniella*. S. 25

— — Über die Kombination von *wa* (weißäugig) und *Biochemica* bei *Ephestia kühniella*. S. 335

Kunze-Mühl, E., und D. Sperlich, Inversionen und chromosomale Strukturtypen bei *Drosophila subobscura* Coll. S. 65

Lüers, H., Biologisch-genetische Untersuchungen über die Wirkung eines Thioxanthonderivates an *Drosophila melanogaster*. S. 93

Lück, H. B., Untersuchungen über die Blattentwicklung an laciniaten und asplenifoliaten dikotylen Gehölzen. S. 497

Maly, R., und A. Wild, Kurze Mitteilung. Ein cytologischer Beitrag zur „Entmischungstheorie" verschiedener Plastidensorten. S. 493

Möller, E. s. Knapp, E. S. 298

Oehlkers, F., Die Auslösung von Mutationen durch Chemikalien bei *Antirrhinum majus*. S. 584

— Bastardierungsversuche in der Gattung *Streptocarpus Lindl.* V. Phänotypische und genotypische Geschlechtsbestimmung bei dem Bastard *Str. (Wendlandii × Rexii)*. S. 722

Pelc, S. R. s. Kaplan, W. D. S. 356

Pringle, C. R., Antigenic variation in *Paramecium aurelia*, variety 9. S. 421

Reimann-Philipp, R., Genetische Untersuchungen an den Tetraden einer höheren Pflanze *(Salpiglossis variabilis)*. S. 187

Reisener-Glasewald, E., Über die Entwicklung des Bestandes an fluoreszierenden Stoffen in den Köpfen von *Ephestia kühniella* in Abhängigkeit von verschiedenen Augenfarbgenen. S. 668

Reeve, E. C. R. s. Tantaway, A. O. S. 648

Richter, H., und M. Hündler, Die geographische Verbreitung der chromosomalen Strukturtypen von *Drosophila subobscura* Coll. S. 85

Robertson, A. s. Falconer, D. S. S. 385

Schwinck, I. s. Hadorn, E. S. 528

Seyffert, W., Über die Wirkung von Blütenfarbgenen bei Cyclamen. S. 311

Simons, J. W. I. M. s. Sobels, F. H. S. 735

Sobels, F. H., Studies on the mutagenic action of formaldehyde in *Drosophila*. II. The production of mutations in females and the induction of crossing-over. S. 743

— and J. W. I. M. Simons, Studies on the mutagenic action of formaldehyde in *Drosophila*. I. The effect of pretreatment with cyanide on the mutagenicity of formaldehyde and of formaldehyde-hydrogen peroxide mixtures in males. S. 735

Sperlich, D. s. Kunze-Mühl, E. S. 65

Stange, L., Zur Frage nach dem Einfluß der Temperatur bei der Auslösung von Chromosomenmutationen in der Meiosis durch Röntgenstrahlen. S. 431

Straub, J. s. Esser, K. S. 625

Tantawy, A. O., and E. C. R. Reeve, Studies in quantitative inheritance. IX. The effects of inbreeding at different rates in *Drosophila melanogaster*. S. 648

Tiele-Winckler, E.-B. v., Codein als hemmende Substanz bei der Auslösung von Chromosomenmutationen von *Oenothera*. S. 338

Trautner, Th. s. Bresch, C. S. 590

Waddington, C. H., On a case of quantitative variation on either side of the wild type. S. 208

Wild, A. s. Maly, R. S. 493

Wricke, G., Ein Fall von Superdominanz bei einer experimentell hergestellten Autotetraploiden von *Arabidopsis thaliana*. S. 47

Band 87 **Inhalt** 5. (Schluß-)Heft

Seite

Auerbach, C., Analysis of the mutagenic action of formaldehyde food. III. Conditions influencing the effectiveness of the treatment. With 6 figures in the text 627

Tantawy, A. O., and E. C. R. Reeve, Studies in quantitative inheritance. IX. The effects of inbreeding at different rates in *Drosophila melanogaster*. With 6 figures in the text 648

Reisener-Glasewald, E., Über die Entwicklung des Bestandes an fluoreszierenden Stoffen in den Köpfen von *Ephestia kühniella* in Abhängigkeit von verschiedenen Augenfarbgenen. Mit 17 Textabbildungen 668

Bochnig, V., Entwicklungsphysiologische und biometrische Untersuchungen an DDT-sensiblen und resistenten Stämmen von *Drosophila melanogaster*. Mit 1 Textabbildung 694

Green, M. M., and K. C. Green, A cytogenetic analysis of the lozenge pseudoalleles in Drosophila 708

Oehlkers, F., Bastardierungsversuche in der Gattung *Streptocarpus Lindl.* V. Phänotypische und genotypische Geschlechtsbestimmung bei dem Bastard *Str. (Wendlandii* × *Rexii)* 722

Sobels, F. H., and J. W. I. M. Simons, Studies on the mutagenic action of formaldehyde in *Drosophila*. I. The effect of pretreatment with cyanide on the mutagenicity of formaldehyde and of formaldehyde-hydrogen peroxide mixtures in males. With 3 figures in the text. 735

Sobels, F. H., Studies on the mutagenic action of formaldehyde in *Drosophila*. II. The production of mutations in females and the induction of crossing-over. With 1 figure in the text. 743

Hoffmann, A., Untersuchungen über die Geschlechtsdifferenzierung bei haploiden und diploiden Gametophyten von *Bryum capillare* L. Mit 17 Textabbildungen 753

Egelhaaf, A., Die fluoreszierenden Stoffe in den Organen dreier Genotypen von *Ephestia kühniella*. Beitrag zur Analyse von Genwirkungen in Pterin- und Tryptophanstoffwechsel. Mit 3 Textabbildungen 769

Bergfeld, R., Entwicklungsgeschichtliche Untersuchungen an einigen Blütenformmutanten der Sippe 50 von *Antirrhinum majus* L. Mit 13 Textabbildungen 784

Autorenverzeichnis 798

Aufnahmebedingungen

Der Inhalt der Arbeit soll dem Gebiet der allgemeinen oder speziellen Genetik, der Cytogenetik, der Grenzfragen der Entwicklungsphysiologie und Genetik, der biophysikalischen Grundlagen der Genetik oder der experimentellen Evolutionsforschung angehören. Arbeiten aus den angewandten Gebieten der Tier- und Pflanzenzüchtung oder der Humangenetik werden nur aufgenommen, wenn die Ergebnisse auch für die Grundlagenforschung wichtig sind.

Die eingereichten Manuskripte müssen völlig druckfertig sein. Der Verlag übernimmt **Korrekturkosten** nur bis zur Höhe von 10% der Satzkosten. Die Manuskripte sind so kurz und übersichtlich wie möglich zu fassen. Außer der deutschen Sprache kann auch eine der anderen drei Kongreßsprachen verwendet werden.

Die für Petitsatz vorgesehenen Manuskriptteile sind am Rande mit einem senkrechten Strich und Hinzufügung des Buchstabens p zu kennzeichnen.

Autorennamen sind im Manuskript mit großen Buchstaben zu schreiben oder doppelt zu unterstreichen.

Lateinische Tier- und Pflanzennamen, Gensymbole und mathematische Formeln sollen *kursiv* gedruckt werden und sind im Manuskript gewellt zu unterstreichen, ebenso weitere Hervorhebungen im laufenden Text. Gesperrter Druck wird nicht ausgeführt.

Literaturhinweise sind im Text durch den Namen des Autors mit der Jahreszahl der Veröffentlichung, z.B. Sax 1947, anzuführen; am Schluß der Arbeit ist ein nach Autorennamen alphabetisch geordnetes Literaturverzeichnis zu geben, welches Titel der Arbeit, Titel der Zeitschrift, Bandzahl, Seitenzahl und Jahreszahl enthält; z.B. Sax, K.: Temperature effects on X-ray induced chromosome aberrations. Genetics **32**, 75 (1947).

Die Abbildungen sind auf das Notwendigste zu beschränken, zu bevorzugen sind durch Strichätzung reproduzierbare Figuren. Diagramme sind als Bleistiftzeichnungen einzureichen. Abbildungsbeschriftungen sind ebenfalls nur mit Bleistift anzugeben. Die Abbildungen sind getrennt vom Text auf besonderem Bogen einzureichen. Die Abbildungsunterschriften gehören dagegen zum Text und sind dem Manuskript beizugeben.

Virus

Die Geschichte vom geborgten Leben. Von Dr. Dr. **Wolfhard Weidel,** Dozent an der Universität Tübingen, Direktor am Max-Planck-Institut für Biologie, Tübingen. (Verständliche Wissenschaft, Band 60.) 1.—6. Tausend. Mit 27 Abbildungen. VIII, 186 Seiten Kl.-8°. Ganzleinen DM 7.80

Inhaltsübersicht: Einleitung. — Betrachtungen zum Begriff „Vermehrung". — Vom technischen Umgang mit Viren: Aufspüren in der Natur. Züchtung. Mengenmessung, Teilchenzählung. Reindarstellung. Chemische Charakterisierung und ein paar Spekulationen. Besichtigung. — Auseinandersetzungen zwischen Virus und Zelle: Der grundsätzliche Unterschied zwischen Virus und lebendem System. Kreislauf des Virus zwischen Ruhe, Aktivität und Ruhe: Der Vermehrungszyklus. Experimentelle Unterteilung des Vermehrungszyklus. — Das Liebesleben der Viren. — Des Pudels Kern. — Virusbekämpfung. — Was ist Virus und woher stammt es?

Hoppe-Seyler / Thierfelder, Handbuch der physiologisch- und pathologisch-chemischen Analyse

Für Ärzte, Biologen und Chemiker. Zehnte Auflage. Herausgegeben von Professor Dr. Dr. **K. Lang,** Direktor des Physiologisch-Chemischen Instituts der Universität Mainz, und Professor Dr. **E. Lehnartz,** Direktor des Physiologisch-Chemischen Instituts der Universität Münster i. W., unter Mitarbeit von Privatdozent Dr. Günther Siebert, Mainz. In fünf Bänden.

Erster Band: **Allgemeine Untersuchungsmethoden 1. Teil.** Bearbeitet von F. Ender, W. Esselborn, B. Flaschenträger, E. Hellman, L. Kofler†, G. Kortüm, M. Kortüm-Seiler, H. Lieb, H. M. Rauen, A. Rittmann, G. Schmid, W. Schöniger, W. Stamm, E. Wiedemann.
Mit 502 Abbildungen. XII, 762 Seiten 4°. 1953. Moleskin DM 185.—
Subskriptionspreis Moleskin DM 148.—

Zweiter Band: **Allgemeine Untersuchungsmethoden 2. Teil.** Bearbeitet von H. Bartels, H. Brintzinger, Th. Bücher, L. K. Christensen, F. Duspiva, S. Emerson, W. Franke, H. Götte, W. Kern, S. Koller, H. A. Künkel, K. Lang, K. Linderstrøm-Lang, W. Maurer, W. Mehren, D. Mohring, A. Niklas, E. Opitz†, L. Schachinger, H. J. Schatzmann, K. Schmeiser, G. Siebert, R. Signer, J. Stauff, W. Wilbrandt.
Mit 534 Abbildungen. XIX, 1086 Seiten 4°. 1955. Moleskin DM 296.—
Subskriptionspreis Moleskin DM 236.80

Dritter Band: **Bausteine des Tierkörpers 1. Teil.** Bearbeitet von H.-J. Bielig, G. Birkofer, K. Dimroth, K. Heyns, L. Jaenicke, J. Kebrle, E. Klenk, K. Lang, H. Lieb, C. Martius, A. Mondon, E. Müller, G. Oertel, H. A. Offe, Th. Ploetz, R. Reuber, J. Schmidt-Thomé, W. Schöniger, R. Tschesche, F. Turba, H. Weil-Malherbe. In zwei Bandteilen. Die beiden Teile werden nur zusammen abgegeben.
Mit 200 Abbildungen. XVI, XV, 2142 Seiten 4°. 1955. Moleskin DM 445.—
Subskriptionspreis Moleskin DM 356.—

Vierter Band: **Bausteine des Tierkörpers 2. Teil.** In Vorbereitung

Fünfter Band: **Untersuchung der Organe, Körperflüssigkeiten und Ausscheidungen.** Bearbeitet von F. Bruns, H. D. Cremer, W. Diemair, C. Dittmar, J. Führ, W. Geinitz, K. Gemeinhardt†, K. Hinsberg, G. Schmid.
Mit 44 Abbildungen. IX, 938 Seiten 4°. 1953. Moleskin DM 168.—
Subskriptionspreis Moleskin DM 134.40

Subskriptionspreise werden gewährt bei Verpflichtung zur Abnahme des gesamten Handbuches

SPRINGER-VERLAG / BERLIN · GÖTTINGEN · HEIDELBERG

Druck der Universitätsdruckerei H. Stürtz AG., Würzburg. Springer-Verlag, Berlin · Göttingen · Heidelberg
Printed in Germany